

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. August 2002 (08.08.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/061106 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12P**
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/01122
- (22) Internationales Anmeldedatum:
4. Februar 2002 (04.02.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
101 04 722.3 2. Februar 2001 (02.02.2001) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **IPK - INSTITUT FÜR PFLANZENGENETIK UND KULTURPFLANZENFORSCHUNG [DE/DE];**
Corrensstrasse 3, 06466 Gatersleben (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **WIRTZ, Markus** [DE/DE]; Markt 12, 06484 Quedlinburg (DE). **HELL, Rüdiger** [DE/DE]; Brechtstrasse 8, 06484 Quedlinburg (DE).
- (74) Anwalt: **NEUEFEIND, Regina**; Maiwald Patentanwalts GmbH, Elisenhof, Elisenstrasse 3, 80335 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING CYSTEINE, CYSTINE AND GLUTATHIONE BY FERMENTATION

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR FERMENTATIVEN HERSTELLUNG VON CYSTEIN, CYSTIN UND GLUTATHION

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting genes and DNA-sequences which code for the enzyme serine acetyltransferase (SAT) and are suitable for the production of cysteine by fermentation. The invention relates to a method for producing compounds containing sulphur such as cysteine, cystine and glutathione in bacteria and other host organisms by overexpression of SAT genes, wherein the host organism is disturbed in their own glutathione synthesis.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Auffindung von Genen und DNA-Sequenzen, die für das Enzym Serin-Acetyltransferase (SAT) kodieren und für die fermentative Herstellung von Cystein geeignet sind. Weiter betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung schwefelhaltiger Verbindungen wie Cystein, Cystin und Glutathion in Bakterien und anderen Wirtsorganismen mittels Überexpression von SAT-Genen, wobei der Wirtsorganismus in seiner eigenen Glutathionsynthese gestört ist.

WO 02/061106 A2

Verfahren zur fermentativen Herstellung von Cystein, Cystin und Glutathion

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Auffindung von Genen und
5 DNA-Sequenzen, die für das Enzym Serin-Acetyltransferase (SAT) kodieren und für
die fermentative Herstellung von Cystein geeignet sind. Weiter betrifft die Erfindung
ein Verfahren zur Herstellung schwefelhaltiger Verbindungen wie Cystein, Cystin
und Glutathion in Bakterien und anderen Wirtsorganismen mittels Überexpression
von SAT-Genen, wobei der Wirtsorganismus in seiner eigenen Glutathionsynthese
10 gestört ist.

Die schwefelhaltige Aminosäure Cystein stellt das Endprodukt der assimilatorischen
Sulfatreduktion in Bakterien, Pilzen und Pflanzen dar. Über seine Rolle in Proteinen
hinaus fungiert Cystein essentiell und ubiquitär in allen Organismen als Donor von
15 reduziertem Schwefel für die Biosynthese weiterer Verbindungen wie Methionin,
Fe/S-Cluster und verschiedene Vitamine (z.B. Biotin). Direkte Verwandte des
Cysteins sind sein Oxidationsprodukt Cystin und das Tripeptid Glutathion (γ -
Glutamylcysteinylglycin). Darüber hinaus haben Cystein, Glutathion und verwandte
Thiolverbindungen wichtige Funktionen bei der Stressabwehr von Mensch und Tier.
20 Cystein kompensiert zudem teilweise den Bedarf an der essentiellen Aminosäure
Methionin.

Die Cystein-Biosynthese erfolgt in Bakterien wie in Pflanzen in einem zweistufigen
Prozess. Im ersten Schritt sorgt Serin-Acetyltransferase (SAT; EC 2.3.1.30) für die
25 Bildung des aktivierten Thioesters O-Acetylserin (OAS) aus Serin und Acetyl-
Coenzym A. Im zweiten Schritt wird freies Sulfid mittels enzymatischer Katalyse
durch O-Acetylserin (Thiol)-Lyase (OAS-TL; EC 4.2.99.8) in O-Acetylserin
eingefügt, um Cystein und Acetat zu erhalten. SAT stellt hierbei die geschwindig-
keitslimitierende Komponente dar, wobei die Aktivität dieses Enzyms ausschließlich
30 in Verbindung mit O-Acetylserin (Thiol)-Lyase in dem Cysteinsynthese-Komplex
gefunden wird. OAS-TL ist bedingt durch die Aktivität SAT-freier Homodimere in
großem Überschuss vorhanden (Kredich et al. (1969) J. Biol. Chem. 244, 2428-2439;
Droux et al. (1998) Eur. J. Biochem. 255, 235-245; Saito (2000) Curr. Opin. Biol. 3,

188 – 195). Cystein ist beinahe die einzige Verbindung, in der reduzierter Schwefel in den Zellstoffwechsel Eingang findet, obwohl Schwefel für die Biosynthese essentieller Verbindungen, einschließlich Methionin, Biotin und Fe/S-Cluster, benötigt wird.

5

Die Herstellung von Schwefel-haltigen Verbindungen wie Cystein, Cystin und Glutathion ist daher von großem biotechnologischem Interesse für pharmakologische Prozesse und für die Nahrungsergänzung.

- 10 Cystein kann durch chemische Synthese oder durch Extraktion aus tierischen Quellen wie Keratin hergestellt bzw. gewonnen werden. Die Produktion von Cystein in Mikroorganismen im Großmaßstab wird hauptsächlich durch regulatorische Mechanismen des cys-Regulons (Kredich (1996) In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology (Neidhardt et al., Eds.), pp. 514 – 527. ASM Press, Washington D.C., USA) und seine Toxizität bei höheren
- 15 Konzentrationen (Harris (1983) J. Bacteriol. 145, 115 – 132; Soerensen and Pedersen (1991) J. Bacteriol. 173, 5244-5246) erschwert. Verschiedene Ansätze wurden verfolgt, um diese Beschränkungen zu umgehen. So kann eine hohe Ausbeute an Cystein im Kulturmedium durch Überexpression einer Exportpumpe für
- 20 verschiedene Metabolite des Cystein-Stoffwechsels erreicht werden, wie für das *ydeD*-Genprodukt von *E. coli* gezeigt werden konnte (Daßler et al. (2000) Mol. Microbiol. 36, 1101 – 1112).

- Die Inhibition von konstitutiv exprimierter *E. coli* SAT (CYSE-Protein, kodiert durch das *cysE*-Gen) durch Cystein ist für die Funktion des cys-Regulons essentiell.
- 25 Die Inhibition der SAT durch Cystein hat eine Inhibitionskonstante (K_i) von ungefähr 10^{-6} M in *Salmonella typhimurium* und *E. coli* (Kredich et al. (1969) vide supra; Kredich (1996) vide supra) und kontrolliert somit effektiv die Flusgeschwindigkeit von reduziertem Schwefel in einer Feedback-Schleife
- 30 (Endprodukthemmung). Es sind Versuche unternommen worden, diesen

Mechanismus durch Screenen nach Cystein-insensitiven Serin-Acetyltransferasen aus *E. coli* mittels zufälliger Mutagenese (random mutagenesis) zu überwinden (Denk and Böck (1987) J. Gen. Microbiol. 133, 515 – 525; Takagi et al. (1999) FEBS Lett. 452, 323 – 327). Alternativ wurde zielgerichtete Mutagenese angewandt, wobei hierbei Aminosäurepositionen innerhalb des SAT-Enzyms ausgetauscht wurden, die in der Nähe der aus dem zufälligen Screening erhaltenen Positionen liegen (Nakamori et al. (1998) J. Appl. Environ. Microbiol. 64, 1607-1611). Obwohl im Rahmen dieser Untersuchungen keine kinetischen Inhibitionskonstanten bestimmt wurden, war es den Autoren möglich, Mutanten mit einer 15-fach weniger sensitiven Feedback-Hemmung zu identifizieren und die Akkumulation beträchtlicher Mengen von Cystein und Cystin im Wachstumsmedium zu erzielen. Weitere Verbesserungen auf der Grundlage von Aminosäureaustauschen scheinen allerdings kaum möglich, da weder die dreidimensionale Struktur der SAT bekannt ist, noch ausreichende Sequenzdaten von Cystein-insensitiven SAT-Formen aus anderen Organismen erhältlich sind.

In einem alternativen Ansatz werden natürlicherweise vorkommende SAT-Proteine genutzt, die in höheren Pflanzen zu finden sind und strukturell mit dem bakteriellen Enzym eng verwandt sind. Pflanzen enthalten im allgemeinen mindestens drei kern-kodierte SAT-Isoformen, die in den Plastiden, dem Cytosol und in den Mitochondrien lokalisiert sind. Diese SAT-Enzyme unterscheiden sich beträchtlich hinsichtlich ihrer Feedback-Sensitivität gegenüber Cystein, was mittels heterologer Expression in *E. coli* gezeigt werden konnte (Noji et al. (1998) J. Biol. Chem. 273, 32739 – 32745; Inoue et al. (1999) Eur. J. Biochem. 266, 220 – 227; Saito (2000) vide supra). Trotz der relativ großen Unterschiede in der Cystein-Empfindlichkeit sind sämtliche SAT-Enzyme in der Lage, einen aktiven Cysteinsynthase-Komplex mit bakterieller OAS-TL zu bilden (Droux et al. (1998), Eur. J. Biochem. 255, 235 – 245). Verschiedene Determinanten für die Cysteinhemmung wurden in Analogie zu SAT aus *E. coli* gemappt (Noji et al. (1998) vide supra; Inoue et al. (1999) vide supra). Ein erster Bericht zeigt, dass die heterologe Expression von SAT-

kodierenden cDNA-Klonen aus *Arabidopsis thaliana* (Bogdanova et al. (1995) FEBS Lett. 358, 43 – 47; Murillo et al. (1995) Cell. Mol. Biol. Res. 41, 425 - 433) in einer effizienten Akkumulation von Cystein im Wachstumsmedium von *E. coli* resultiert (Tagaki et al. (1999) FEMS Microbiol. Lett. 179, 453 – 459).

5

Angeichts des Bedarfs für effiziente Verfahren zur Herstellung von Cystein ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, neue Feedback-insensitive SAT-Gene und -Isoformen bereitzustellen, die in leistungsstarken Verfahren zur Herstellung von großen Mengen von Cystein und verwandten schwefelhaltigen Verbindungen in Bakterien und anderen Organismen eingesetzt werden können.

10

Weitere Aufgaben liegen in der Bereitstellung eines Verfahrens zur Selektion Cystein-insensitiver SAT-Gene sowie in der Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung von Cystein, Cystin und Glutathion in Mikroorganismen.

15

Die Lösungen dieser Aufgaben sind in den beigefügten unabhängigen Patentansprüchen angegeben. Bevorzugt Ausführungsformen werden in den Unteransprüchen beschrieben. Weitere Aufgaben und Lösungen ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung.

20

Es ist überraschenderweise gelungen, einen neuen erfolgreichen Screening-Ansatz für cDNA-Klone, die für Cystein-insensitive SAT-Isoformen kodieren, aufzuzeigen. Dabei wird ein neuer *E. coli*-Stamm verwendet, in dem das *cysE*-Gen, welches für die bakterielle SAT kodiert, durch Mutation inaktiviert ist. Mittels funktionaler Komplementation können unter Einsatz einer solchen SAT-freien *E. coli*-Mutante SAT-Gene mit weniger ausgeprägter Feedback-Hemmung selektioniert werden. Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Auffindung von DNA-Sequenzen, die für Cystein-insensitive Serin-Acetyltransferasen kodieren, gekennzeichnet durch die Verwendung eines *cysE*⁻-Bakterienstammes für funktionale Komplementation. Bei dem Bakterienstamm handelt es sich bevorzugt um einen *Escherichia coli*-Stamm.

25

30

Das erfindungsgemäße Verfahren ist somit besonders nützlich zur Identifizierung von natürlich vorkommenden, Cystein-insensitiven SATs aus Pflanzen, Mikroorganismen oder anderen Quellen mit Eignung zur mikrobiellen
5 Fermentierung von Cystein.

Unter dem Begriff "Cystein-insensitive Serin-Acetyltransferase" wird im Rahmen dieser Erfindung eine Serin-Acetyltransferase verstanden, die einen I_{50} -Wert (I_{50} = halbmaximale Inhibition) von mindestens 30 μ M, bevorzugt von mindestens 35,
10 40 μ M und besonders bevorzugt von mindestens 45 μ M, 50 μ M, und am meisten bevorzugt von mindestens 55 μ M, 60 μ M aufweist.

Der I_{50} -Wert ist hier als die Cystein-Konzentration definiert, bei der unter ansonsten optimalen Bedingungen eine 50%-ige Hemmung der SAT-Aktivität eintritt. Der I_{50} -
15 Wert wird durch Bestimmung der SAT-Aktivität unter steigenden Cystein-Konzentrationen bestimmt. Durch Auftragung der Aktivität gegen die Cystein-Konzentration erhält man eine hyperbolische Funktion, aus der durch curve-fitting oder manuell der I_{50} -Wert ermittelt wird. Die Inhibitorkonstante K_i ist, unabhängig vom Hemmtyp, zunächst als Dissoziationskonstante eines Enzym-Inhibitor-
20 Komplexes definiert ($K_i = [E][I]/[EI]$, nach A. L. Lehninger, Verlag Chemie 1977) und hat keine direkte Beziehung zum I_{50} -Wert. Prinzipiell korreliert aber ein niedriger K_i -Wert mit einem niedrigen I_{50} -Wert für einen Inhibitor.

Der Begriff "funktionale Komplementation" bedeutet, dass eine bestimmte
25 Enzymaktivität eines bezüglich dieser Enzymaktivität defizienten Bakterienstammes durch Expression eines heterologen Gens, das für diese Enzymaktivität kodiert, unter Kontrolle eines geeigneten bakteriellen Promotors die Enzymaktivität in dem Bakterienstamm wiederherstellt.

Die Wiederherstellung der Enzymaktivität erlaubt unter geeigneten Bedingungen (im Rahmen der vorliegenden Erfindung in Abwesenheit von Cystein) das prototrophe Wachstum des ansonsten auxotrophen, defizienten Bakterienstammes.

- 5 Das bakterielle *cysE*-Gen kodiert, wie bereits oben erwähnt, für die bakterielle Serin-Acetyltransferase; die DNA-Sequenz des *cysE*-Gens ist im Stand der Technik beschrieben, z.B. in Denk und Böck (1987) J. Gen. Microbiol. 133, 515 – 525.

- Die Herstellung erfindungsgemäßer Bakterienstämme, die aufgrund der
- 10 Inaktivierung im *cysE*-Gen für das Screenen nach *cys*-insensitiven SAT-Genen mittels funktionaler Komplementation geeignet sind, wird in den Beispielen beschrieben. Diese Bakterienstämme werden im Rahmen dieser Erfindung als SAT-defizient oder SAT-frei bezeichnet.
- 15 Dem Fachmann sind die für die Inaktivierung bakterieller Gene mittels Mutation erforderlichen Techniken bekannt, z.B. aus dem Standardwerk von Sambrook et al. (1989) Molecular cloning: Laboratory Manual, 2. Auflage, Coldspring Harbour Laboratory Press, Coldspring Harbour, New York. Darüber hinaus sind SAT-freie Bakterienstämme von Stammsammlungen erhältlich, z.B. die *E. coli*-Stämme
- 20 EC1801 und JM39, die vom *E. coli* Genetic Stock Center, Yale University, New Haven, CT, USA, bezogen werden können.

- Wie in den nachfolgenden Beispielen erläutert, folgte die Erzeugung der SAT-freien *E. coli*-Mutante MW1 einem mikrobiologischen Standardverfahren (Hamilton et al.
- 25 (1989) J. Bacteriol. 171, 4617 – 4622). Dieses und ähnliche Verfahren zur Insertionsmutagenese durch homologe Rekombination sind vielfach beschrieben (z.B. Walkenhorst et al. (1995) Microbiol. Res. 150, 347 – 361; Link et al. (1997) J. Bacteriol. 179, 6228 – 6237; Selbischka et al. (1993) Appl. Microbiol. Biotechnol. 38, 615 – 618). Das biologische Prinzip ist in Standardwerken beschrieben (H.A.

Nash, In: *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology, Vol. I. F.C. Neidhardt et al., eds., ASM Press, Washington DC, 1996, Seiten 2363 – 2376).

5 Für die Herstellung eines genetisch stabilen SAT-defizienten Stammes wird die in den angefügten Beispielen beschriebene Mutagenese durch homologe Rekombination, wie z. B. von Hamilton et al. (1989, vide supra) beschrieben, bevorzugt.

10 Das Screenen nach Genen mittels funktionaler Komplementation ist sehr stark von der genetischen Stabilität des Wirtsorganismus, also der Stabilität der für die Selektion ausgenutzten Mutation abhängig. Dies gilt insbesondere für die heterologe Komplementation zwischen entfernten Taxa und den Fall, dass wegen der ausgeprägten genomischen Komplexität des Donororganismus, z.B. eine höhere Pflanze, sehr viele Klone durchmustert werden müssen. Die im Stand der Technik
15 beschriebenen SAT-defizienten Bakterienstämme sind in einigen Fällen aufgrund ihrer genetischen Instabilität nicht für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet. Zum einen müssen sehr viele Klone der pflanzlichen cDNA-Banken gescreent werden, zum anderen ist der Hemmtest auf Cystein-Sensitivität nur ohne endogenen SAT-Hintergrund durchführbar, da bakterielle SAT-Aktivitäten extrem sensitiv
20 gegenüber Cystein sind.

Die im Rahmen dieser Erfindung erzeugten SAT-defizienten Stämme zeichnen sich dadurch aus, dass sie praktisch keine Reversion des Phänotyps zeigen. Diese genetisch äußerst stabilen Stämme sind besonders nützlich für die funktionale
25 Komplementation zur Auffindung von Genen, die für Cystein-insensitive SATs kodieren.

Der in den Beispielen beschriebene Stamm MW1, der keinerlei Reversion zeigt, kann auch eingesetzt werden, um existierende Bakterienstämme mit MW1 zu

- 8 -

transduzieren. Auf diese Weise werden weitere Cystein-auxotrophe Stämme erzeugt, die sich durch die gewünschte genetische Stabilität auszeichnen.

Die funktionale Identität der Genotypen wurde im Rahmen der Erfindung verifiziert
5 i) biochemisch durch Enzymtests, ii) genetisch durch DNA-DNA-Hybridisierung und iii) physiologisch durch Komplementation mit bekannten pflanzlichen cDNAs.

Das Screening mittels funktionaler Komplementation ist dem Fachmann geläufig und z.B. beschrieben in Howarth et al. (1997) Biochim. Biophys. Acta 1350, 123 – 127;
10 Noji et al. (1994) Mol. Gen. Genet. 244, 57 – 66, und Setya et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 13383 – 13388.

Schließlich benötigt man für das Screening mittels funktionaler Komplementation eine geeignete cDNA-Bibliothek aus dem Organismus, aus dem Cystein-insensitive
15 SAT-Gensequenzen isoliert werden sollen. Die Herstellung von cDNA-Bibliotheken ist dem Fachmann ebenfalls geläufig und mittels molekularbiologischer Routinemethoden möglich. Darüber hinaus sind cDNA-Bibliotheken heutzutage aus fast jedem Organismus kommerziell erhältlich, z.B. von Firmen wie Stratagene, La Jolla, USA.

20 Die Erfindung betrifft auch Gene, die für Cystein-insensitive SAT-Enzyme und – Isoformen kodieren und mittels des oben beschriebenen Screeningverfahrens auf der Grundlage der funktionalen Komplementation isoliert werden.

25 In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei diesen SAT-Gensequenzen um Sequenzen aus Pflanzen, insbesondere aus *Nicotiana tabacum*.

Besonders bevorzugt sind dabei die cDNA-Sequenzen der *Nicotiana tabacum* SAT-Gene 1, 4 und 7, die als Sequenzen beigefügt sind: cDNA-Sequenz von SAT 1 als
30 SEQ ID NO. 1, die davon abgeleitete Aminosäuresequenz als SEQ ID NO. 2; die

cDNA-Sequenz von SAT 4 als SEQ ID NO. 3, die davon abgeleitete Aminosäuresequenz als SEQ ID NO. 4; die cDNA-Sequenz von SAT 7 als SEQ ID NO. 5 und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz als SEQ ID NO. 6.

5 Die Erfindung betrifft somit auch eine DNA-Sequenz, die für ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Serin-Acetyltransferase aus *Nicotiana tabacum* kodiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- 10 a) DNA-Sequenzen, die eine Nukleotidsequenz umfassen, die die in SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 4 oder SEQ ID NO. 6 angegebene Aminosäuresequenz oder Fragmente davon kodieren,
- b) DNA-Sequenzen, die die in SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 3 oder SEQ ID NO. 5 angegebene Nukleotidsequenz oder Teile davon umfassen,
- c) DNA-Sequenzen, die eine Nukleotidsequenz, die mit einem komplementären Strang der Nukleotidsequenz von a) oder b) hybridisiert, oder Teile dieser
15 Nukleotidsequenz umfassen,
- d) DNA-Sequenzen, die eine Nukleotidsequenz, die zu einer Nukleotidsequenz von c) degeneriert ist, oder Teile dieser Nukleotidsequenz umfassen,
- e) DNA-Sequenzen, die ein Derivat, Analog oder Fragment einer
20 Nukleotidsequenz von a), b), c) oder d) darstellen.

Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Coldspring Harbour,
25 Laboratory Press, Coldspring Harbour, New York, beschrieben sind.

Die im Rahmen der Erfindung einsetzbaren SAT-Nukleinsäuremoleküle umfassen auch Fragmente, Derivate und allelische Varianten der oben beschriebenen DNA-Sequenzen, die für SAT kodieren oder ein biologisch, d.h. enzymatisch aktives
30 Fragment davon. Unter Fragmenten werden dabei Teile der Nukleinsäuremoleküle

verstanden, die lang genug sind, um ein Polypeptid oder Protein mit der enzymatischen Aktivität einer SAT oder einer vergleichbaren enzymatischen Aktivität zu kodieren. Der Ausdruck Derivat bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Sequenzen dieser Moleküle sich von den Sequenzen der oben genannten

5 Nukleinsäuremoleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Homologie zu diesen Sequenzen aufweisen. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 70%, bevorzugt 80%, insbesondere eine Identität von mindestens 85% und 90%, vorzugsweise mindestens 92% und besonders bevorzugt mindestens 95%, 98%, 99%, oder dass die homologe Sequenz

10 unter stringenten Bedingungen, die dem Fachmann geläufig sind, mit den vorstehend genannten SAT-Sequenzen hybridisiert. Die Abweichung zu den oben beschriebenen Nukleinsäuremolekülen können dabei durch Deletion, Addition, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein. Homologie bedeutet ferner, dass funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen den betroffenen

15 Nukleinsäuremolekülen und den durch sie kodierten Proteinen besteht.

Die Erfindung betrifft auch für SAT kodierende Sequenzen aus anderen Pflanzen, die mit den in SEQ ID No. 1, 3 und 5 gezeigten Nukleinsäuresequenzen in der kodierenden Region eine Identität von mindestens 80%, 85%, 90% und insbesondere

20 mindestens 94%, 96% zeigen. Besonders bevorzugt handelt es sich dabei um DNA-Sequenzen, die mit der in SEQ ID No. 3 (SAT 4 aus Tabak) gezeigten Nukleinsäuresequenz in der kodierenden Region eine Identität von mindestens 80%, 85%, 90% und insbesondere mindestens 94%, 96% aufweisen.

25 Der Grad der Sequenzidentität eines Nukleinsäuremoleküls mit den im Sequenzprotokoll angegebenen Sequenzen kann mit üblichen Algorithmen bestimmt werden. Geeignet ist hier beispielsweise das Programm zur Bestimmung der Sequenzidentität, das unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (auf dieser Seite z.B. der Link „Standard nucleotide-nucleotide BLAST [blastn]“) zugänglich ist.

Abbildung 2 zeigt einen Vergleich der im Rahmen dieser Anmeldung isolierten SAT-Sequenzen aus Tabak mit fünf bekannten SAT-Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* (in der MIPS Genom-Nomenklatur) und der bekannten SAT-Sequenz aus *E. coli*. Aus diesem Aminosäure-Alignment ist erkennbar, dass sich die Cystein-

5 insensitive SAT 4 aus Tabak, die im Rahmen dieser Erfindung isoliert werden konnte, von den bekannten SAT-Sequenzen interessanterweise in zwei Positionen unterscheidet:

i) eine Insertion von zwei Resten, einem Cystein und einem Serin, in Position 63 und 64 innerhalb der Aminosäuresequenz der SAT 4; und

10 ii) eine Deletion von drei Aminosäuren in der Nähe des C-Terminus; beide Stellen sind in Abbildung 2 unterlegt.

Die Erfindung betrifft somit auch DNA-Sequenzen, die für SAT kodieren und eine der in Abbildung 2 markierten Deletion oder Insertion entsprechende Deletion oder Insertion, oder beide Merkmale, aufweisen, wobei die Position natürlich relativ zu SAT 4 aus Tabak variieren kann. Besonders bevorzugt weisen die SAT-Sequenzen 15 neben den genannten zwei Merkmalen, die sie von bekannten SAT-Genen unterscheiden, zusätzlich eine starke Homologie zu der gesamten kodierenden Sequenz von SAT 4 (SEQ ID No. 3) auf.

20 Die genannte Insertion muss auch nicht zwangsläufig zwei Aminosäurereste umfassen, es kann auch nur ein Rest oder mehr als zwei Reste im Vergleich zu anderen SAT-Sequenzen inseriert sein. Die Insertion befindet sich dabei innerhalb des konservierten Motivs:

L F/L/MY E/D L/I F X X V/T/A/I D L X A F/V/A K/R X R D

25 P A C I/L/V S Y/F (worin X eine beliebige Aminosäure ist), siehe Abbildung 2, entspricht dem Motiv zwischen Position 63 und Position 98 des SAT-Gens aus *E. coli*.

Die genannte Deletion muss auch nicht zwangsläufig drei Aminosäurereste

30 umfassen, es kann auch nur ein Rest, zwei Reste oder mehr als drei Reste im

- 12 -

Vergleich zu anderen SAT-Sequenzen deletiert sein. Die Deletion befindet sich dabei innerhalb der letzten 20 C-terminalen Aminosäuren, insbesondere in dem konservierten Motiv:

C/G/S L/E/M X M D/K/E H/Q X S/A/E X X X E/F W/F S/R D/H V/Y

- 5 (worin X eine beliebige Aminosäure ist), siehe Abbildung 2, entspricht dem Motiv zwischen Position 259 und Position 274 des SAT-Gens aus *E. coli*.

- 10 In jedem Fall kann der Fachmann durch einen Sequenzvergleich, wie in Abbildung 2 dargestellt, ohne Probleme feststellen, ob eine von ihm mittels dem erfindungs-
gemäßen Verfahren isolierte SAT-Sequenz eines der für SAT 4 aus Tabak
beobachteten Merkmale, also die genannte Deletion und/oder Insertion, an einer der
Position innerhalb von SAT 4 entsprechenden Stelle aufweist. Dabei müssen nicht
zwangsläufig die identischen Aminosäuren deletiert bzw. inseriert sein, entscheidend
ist, ob sich überhaupt eine Deletion und/oder Insertion in den entsprechenden
15 Positionen befindet.

- Die Auffindung pflanzlicher SAT-Sequenzen, die eine starke Homologie zu den in
dieser Anmeldung offenbarten Sequenzen aus Tabak haben und sich deshalb
aufgrund einer stark ausgeprägten Cystein-Insensitivität besonders gut zur
20 Herstellung von Cystein in Mikroorganismen eignen, kann zum einen mittels
funktionaler Komplementation, wie hier beschrieben, erfolgen. Zum anderen aber
auch mittels klassischer Verfahren, wie Hybridisierung oder PCR. Dabei können die
im beigefügten Sequenzprotokoll offenbarten Sequenzen oder Teile davon als
Hybridisierungssonde eingesetzt werden. Ebenso kann der Fachmann natürlich
25 anhand der offenbarten Sequenzen geeignete PCR-Primer entwerfen und für die
Amplifizierung von SAT-kodierenden Sequenzen einsetzen.

- Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung Schwefel-haltiger
Verbindungen, insbesondere von Cystein, Cystin und Glutathion, in
30 Wirtsorganismen, insbesondere Mikroorganismen durch Überexpression der nach

oben beschriebenen Screeningverfahren mittels funktionaler Komplementation aufgefundenen Cystein-insensitiven SAT-Gene oder anderer SAT-Gene mit der gewünschten Cystein-Insensitivität in Wirtsorganismen.

- 5 In Abbildung 3 ist die Akkumulation von Cystein in *E. coli*-Kulturen, die die SAT-Sequenzen aus Tabak exprimieren gezeigt. Dabei wurden die Sequenzen SAT1, SAT4 und SAT7 aus Tabak in dem Stamm MW1 exprimiert. Die Zelldichte (schwarze Punkte) und Cysteingehalte im Kulturmedium wurden während des Wachstums, wie angegeben, bestimmt. C600 ist der Wildtyp.

10

Durch Expression der SAT4 aus Tabak konnten Gesamt-Cystein-Gehalte von bis zu 300 mg/l Kulturmedium erhalten werden.

15

Die Erfindung betrifft somit auch ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Cystein, bei dem Cysteingehalte im Wachstumsmedium der Bakterien erreicht werden, die bei mindestens 20 mg/l, vorzugsweise mindestens 50 mg/l und besonders bevorzugt bei mindestens 100, 200 mg/l Kulturmedium liegen. Im Vergleich zum Wildtyp-Stamm wird mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens unter Expression einer Cystein-insensitiven SAT eine Erhöhung des Cystein-Gehalts im

20

Wachstumsmedium von mindestens 3fach, vorzugsweise mindestens 5fach und besonders bevorzugt von mindestens 10fach, 20fach erreicht.

25

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Mikroorganismus, der für die Überexpression der Cystein-insensitiven SAT-Gensequenzen eingesetzt wird, um einen Glutathion-defizienten Stamm. Bevorzugt handelt es sich bei dem Glutathion-defizienten Bakterienstamm um den *E. coli*-Stamm JTG10 mit dem chromosomalen Marker gshA20::Tn10kan, der beispielsweise vom *E. coli* Genetic Stock Center, Yale University, New Haven, CT, USA, bezogen werden kann (CGSC# 6926) und ursprünglich beschrieben wurde von Greenberg & Demple

30

(1986, J. Bacteriol. 168, 1026).

Ein weiterer geeigneter Glutathion-defizienter Bakterienstamm ist beispielsweise der *E. coli*-Stamm 821, ID # 9836 mit der Mutation *gshA2* (Apontoweil und Behrends (1975) Mol. Gen. Genet. 141, 91 – 95), der ebenfalls vom *E. coli* Genetic Stock Center, Yale University, New Haven, CT, USA, bezogen werden kann.

Die Verwendung eines Glutathion-defizienten Stammes bietet den Vorteil, dass die Abwesenheit von Glutathion als Kontrollmittel für die Akkumulation von Cystein in der Bakterienzelle in der Sekretion von Cystein aus der Bakterienzelle in das Wachstumsmedium resultiert. Dieser Effekt führt zu einer beträchtlichen Steigerung der insgesamten Cysteinanreicherung.

Die Verwendung eines Glutathion-defizienten Stammes zur Produktion von Cystein wurde im Stand der Technik bisher nicht erwogen. Die im Rahmen dieser Erfindung erstmals beobachtete Überproduktion von Cystein in einem Glutathion-defizienten Stamm ist auch als überraschend anzusehen, da Glutathion u.a. als wichtiger Schutz vor oxidativem Stress in Bakterien gilt und die erfolgreiche Überproduktion von Cystein durch einen Glutathion-defizienten Stamm in einer aeroben Kultur somit keinesfalls erwartet werden konnte.

Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Herstellung von Cystein, Cystin und Glutathion in Mikroorganismen, insbesondere Bakterien, dadurch gekennzeichnet, dass in dem Mikroorganismus eine DNA-Sequenz exprimiert wird, die für eine Cystein-insensitive Serin-Acetyltransferase kodiert, und es sich bei dem Mikroorganismus um eine Glutathion-defiziente Zelle handelt.

Dabei werden die in dem Glutathion-defizienten Mikroorganismus exprimierten DNA-Sequenzen für SAT in der Regel danach ausgewählt werden, dass sie die gewünschte Überproduktion von Cystein in dem Mikroorganismus zeigen. Cystin

- 15 -

und Glutathion entstehen dabei als Folge der Cysteinüberproduktion bzw. können durch gezielte Maßnahmen bevorzugt gebildet werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um ein SAT-Gen, das unter
5 Verwendung des oben beschriebenen erfindungsgemäßen Screeningverfahrens mittels funktionaler Komplementation identifiziert wird. Bevorzugt handelt es sich hierbei um pflanzliche SAT-Gene, besonders bevorzugt aus *Nicotiana tabacum*.

Die in dieser Anmeldung offenbarten Sequenzen kodieren für pflanzliche SAT-
10 Enzyme, die sich gegenüber SAT-Proteinen aus der Literatur durch stark verminderte Sensitivität gegenüber Cystein auszeichnen. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Auffindung Cystein-insensitiver SAT-Sequenzen können weitere geeignete kodierende Sequenzen, insbesondere aus Pflanzen, identifiziert und auf ihre Eignung zur Überproduktion von Cystein in Mikroorganismen untersucht werden. Mit Hilfe
15 des erfindungsgemäßen Screeningverfahrens können noch besser geeignete SAT-Gene aufgefunden werden, also Gene, die für Protein kodieren, die eine noch ausgeprägtere Cystein-Insensitivität zeigen. Wenn wie hier beschrieben, cDNA-Klone isoliert werden, können die kodierten SAT-Proteine durch Standardverfahren in Bakterien exprimiert und in existierende Stämme zur Verbesserung der
20 Cysteinproduktion eingebracht werden, wobei hier bevorzugt Glutathion-defiziente Stämme eingesetzt werden.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Mikroorganismus um einen Glutathion-defizienten Bakterienstamm, insbesondere
25 um einen Bakterienstamm, der im ersten Glutathionsyntheseschritt (*gshI*) durch Mutation inaktiviert ist.

Der besonders bevorzugte Stamm JTG10 enthält ein durch Transposon Tn10kan inaktiviertes *gshA*-Gen, welches für das erste Enzym der Glutathionsynthese, γ -
30 Glutamylcystein-Synthetase, kodiert. Jede Inaktivierung dieses Gens das zur

vollständigen oder teilweisen Reduktion der Enzymaktivität führt, ist für die erfindungsgemäße Cystein-Überproduktion geeignet.

Die Expression der Cystein-insensitiven SAT-Gene in einem Glutathion-defizienten
5 Bakterienstamm führt dazu, dass das gebildete Cystein aus der Zelle ausgeschleust
wird und sich im umgebenden Kulturmedium in hohen Konzentrationen als Cystein
und Cystin anreichert. Die angereicherten Schwefel-haltigen Verbindungen können
dann mittels Standardverfahren aufgereinigt werden. Die Reinigung von Cystein aus
10 wässrigen Lösungen ist z.B. in den Patentschriften JP56140966A2 (Preparation of
purified cysteine) und JP61057549 (Method of purifying cysteine) beschrieben.
Prinzipielle Verfahren zur Reinigung von Aminosäure mit Kationen-Austauscher-
Chromatographie sind z.B. beschrieben bei T. G. Cooper (Biochemische
Arbeitsmethoden, W. de Gruyter Verlag, Berlin, 1980).

15 Die für die Herstellung eines für die fermentative Herstellung von Cystein, Cystin
und Glutathion geeigneten Mikroorganismus erforderlichen Techniken, wie die
Transformation von Bakterien mit Plasmiden, die Selektion transformierter
Bakterien, die Kultivierung von Bakterien in geeigneten Wachstumsmedien, sind
dem Fachmann bestens bekannt und beschrieben, z.B. in Sambrook et al. (1989) vide
20 supra.

Gleiches gilt für die Herstellung bakterieller Expressionsvektoren mittels
herkömmlicher Techniken; darüber hinaus sind geeignete Expressionsvektoren für
die Überexpression heterologer Gene in Bakterien kommerziell erhältlich, z.B. von
25 der Firma Qiagen, Hilden Deutschland.

Die Nutzung des synthetisierten und akkumulierten Cysteins liegt insbesondere in
der Supplementierung der Nahrung für Mensch und Tier. Weiter können hieraus
Derivate wie z.B. N-Acetylcystein auf einfache Weise hergestellt werden, die
30 pharmazeutische und kosmetische Anwendung haben.

Die Erfindung wird im Folgenden in den nachfolgenden Beispielen erläutert, die nur der Veranschaulichung der Erfindung dienen und in keiner Weise als Einschränkung zu verstehen sind.

5

Beispiele

Allgemeine Klonierungs- und PCR-Verfahren wurden nach Sambrook et al. (1989, vide supra) durchgeführt. DNA-Sequenzen wurden mit einem 373A-Sequencer (Perkin-Elmer, Boston, USA) erhalten.

Die verwendete cDNA-Bibliothek aus *N. tabacum* cv. Samsun wurde in λ -ZAPII nach Angaben und mit Materialien des Herstellers, Stratagene, erstellt. *In vivo*-Excision erfolgte ebenfalls nach Herstellerangaben (Stratagene), um rekombinante Plasmide aus der Phagenbank zu erhalten. Diese können zur Transformation des SAT-defizienten *E. coli*-Stammes verwendet werden.

Southern Blot-Analyse von genomischer DNA von *E. coli* wurde, wie in Hell et al. (1994, FEBS Lett. 351, 257 – 262) beschrieben, mit dem unten angegeben 2,2 kb *cysE*-Fragment als Hybridisierungssonde durchgeführt.

Herstellung eines *cysE*-Bakterienstammes

25

Die insertionelle Inaktivierung des Wildtyp *cysE*-Gens von *E. coli* C600 (*thr leu thi lac* (λ)-P1+F'; Clontech, Heidelberg, Deutschland) wurde wie von Hamilton et al. (1989) J. Bacteriol. 171, 4617 - 4622 beschrieben, durchgeführt. Hierdurch sollte ein SAT-defizienter Stamm erzeugt werden, der im Vergleich zu gegenwärtig erhältlichen Stämmen eine erhöhte Stabilität aufweist. Das Wildtyp *cysE*-Gen wurde

30

- 18 -

einschließlich seiner flankierenden Bereiche mittels PCR mit genomischer DNA vom Stamm C600 und den Primern

5 ECS155 5'-CGTGGATCCTTAGGCGATCAAATTCC-3' und
ECS156 5'-GGGGAGTCGACGGCGCTGTATGTACTCCCT-3'

amplifiziert.

Das PCR-Protokoll war wie folgt:

10

In 50 µl Reaktionsvolumen befanden sich:

20 pmol der beiden Primer, 10 ng genomische DNA, 1 U Taq-Polymerase (Promega, Heidelberg, Deutschland), Polymerase-Puffer von Promega nach Herstellerangaben. Nach 5 Min. bei 94°C folgten 35 Zyklen mit 30 Sek. bei 94°C, 30 Sek. bei 58°C, 60

15 Sek. bei 72°C, gefolgt von 10 Min. bei 72°C.

Das resultierende 2,2 kb DNA-Fragment wurde in die Restriktionsschnittstellen Sall und BamHI von linearisiertem pUC18 ligiert. Innerhalb dieses Plasmids wurde das *cysE*-Gen mit ClaI bei Position 522, bezogen auf den offenen Leserahmen, geschnitten und durch Insertion eines 2,2 kb ClaI/ClaI-Fragments von pACYC184-Gm inaktiviert. Dieses Fragment aus dem Plasmid pACYC184-Gm (Chang and Cohen (1978) J. Bacteriol. 134, 1141 – 1156) trägt ein Gentamycin-Resistenzgen; das resultierende pUC-Plasmid wurde pUC18*cysE*-Gm genannt. In diesem Plasmid können somit maximal 174 Aminosäuren des *E. coli*-SAT-Enzyms translatiert werden. Die *cysE*-Gm-Kassette wurde mit Sall und BamHI ausgeschnitten und als 4,4 kb Fragment in die gleichen Schnittstellen des Plasmids pMAK705 ligiert, welches ein Kanamycin-Resistenzgen und einen Temperatur-sensitiven Replikationsursprung trägt (pHO1; Hashimoto-Gotoh and Sekiguchi (1977) J. Bacteriol. 131, 405 - 412). Das resultierende Plasmid pMW1 wurde für den

20
25
30

Genaustausch mittels homologer Rekombination eingesetzt. Zu diesem Zweck wurde

der Stamm C600 mit pMW1 transformiert, um Kanamycin-resistente Kolonien bei 44°C (nicht-permissive Temperatur) zu selektionieren. Cointegrate wurden von dem Plasmid zuerst durch Kultivierung bei 30°C (permissive Temperatur), gefolgt von nicht-permissiven Bedingungen gereinigt und der resultierende Cystein-auxotrophe Stamm wurde MW1 genannt (*thr leu thi lac* (λ)-P1+F' *cysE* *Gm^R*). Auf diese Weise wurde das inaktivierte *cysE*-Gen in das Genom von *E. coli* C600 via homologe Rekombination eingeführt.

Die Komplementations- und Auxotrophie-Tests wurden auf festem M9-Minimal-medium, ergänzt mit IPTG (1 mM), Ampicillin (100 µg/ml), Gentamycin (50 µg/ml), Thiamin (0,1 mM) und 1 mM sämtlicher Aminosäuren mit Ausnahme von Methionin und Cystein durchgeführt. Einzelne Plasmide oder die cDNA-Bibliothek aus Tabak wurden mittels Elektroporation (BioRad, München, Deutschland) in den Stamm MW1 eingeführt und Kolonien wurden durch Inkubation bei 37°C für bis zu 48 Stunden selektioniert.

Proteinexpression und Enzymtests

Die Expression von SAT-Enzymen wurde in sämtlichen Konstrukten mit Isopropyl-Thiogalaktosid in Vollmedium (LB) oder Minimalmedium (M9), ergänzt mit Ampicillin oder Gentamycin oder beidem, induziert (Bogdanova et al. (1995) vide supra; Wirtz et al. (2000) In Brunold et al., eds, Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants: Molecular, Biochemical and Physiological Aspects. P. Haupt Bern, Seiten 297-298). Die Zellen wurden geerntet und durch Ultraschallbehandlung (Sonicator Bandelin, Berlin, Deutschland) aufgeschlossen, anschließend wurde der lösliche Überstand (10 Min. bei 30.000 x g) durch Gelfiltration auf einer PD 10-Säule (Amersham, Freiburg, Deutschland) entsalzt und bei -80°C gelagert. Die Proteingehalte wurden nach Bradford (1976) bestimmt. Die SAT-Aktivität von gereinigten Fraktionen und Rohfraktionen wurde in 250 µl, enthaltend 50 mM Tris-

- 20 -

- HCl, pH 7,5, 0,2 mM Acetyl-CoA, 2 mM Dithiothreitol und 5 mM Serin in Gegenwart oder Abwesenheit variierender Cystein-Konzentrationen untersucht. Die Absorption bei 232 nm wurde für mehrere Minuten nach Kredich and Becker (1971, In *Methods in Enzymology* (Tabor H. and Tabor C.W., eds) Seiten 459-469, Academic Press, New York, USA) dokumentiert. SAT-Aktivitäten wurden nach Nakamura et al. (1987, *Plant Cell Physiol* 28, 885-891) bestimmt.

Quantifizierung der Thiole

- Für die Quantifizierung der Thiole wurde der Gehalt an Cystein und Glutathion im Medium bzw. in den Zellen nach Extraktion mit 0,1 N HCl in einem 1:5-Verhältnis bestimmt. Nach Reduzierung mit Dithiothreitol wurden die Sulfhydryl-Gruppen mit Monobromobiman (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) derivatisiert. Die Auftrennung, Detektion und Quantifizierung der fluoreszierenden Addukte wurde mittels HPLC durchgeführt (reversed-phase-Säule Waters Nova-Pak C18, 4,6 x 250 mm; Waters HPLC-System; Hell and Bergmann (1990) *Planta* 180, 630-612).
- Identifizierung von cDNA-Klonen, die für Cystein-insensitive SAT kodieren, durch Komplementation von MW1
- Elektroporations-kompetente Zellen von MW1 wurden mit einer Plasmid-cDNA Bank (erhalten durch in vivo-Excision der λ ZAPII-Bank) von *Nicotiana tabacum* var. SNN transformiert. Die Regeneration der Zellen erfolgte in 1 ml LB-Vollmedium bei 37°, 220 rpm für 1 Stunde. Das Volumen wurde auf 2 Petrischalen ausplattiert, die M9-Minimalmedium (Sambrook et al. (1989), vide supra) mit 100µg/ml Ampicillin, 50µg/ml Gentamycin und 1 mM Isopropylthiogalaktosid enthielten sowie je 1 mM aller proteinogenen Aminosäuren außer Cystein und Methionin. Die Schalen wurden für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die erhaltenen

- 21 -

Kolonien wurden danach weiter kultiviert und zur Überprüfung der Cystein-Sensitivität der selektierten SAT bzw. Plasmidisolierung herangezogen.

Die Überprüfung der Cystein-Insensitivität erfolgte auf zweierlei Art:

5

1. Selektierte Kolonien wurden in 4 ml LB-Medium vermehrt. Ein Aliquot entsprechend einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,05 wurde zur Inoculation einer Schüttelkultur mit 20 ml C1-Medium (Minimalmedium nach Nakamori et al. (1998) Appl. Environm. Microbiol. 64, 1607-1611, ergänzt mit 0,1 mM Thiamin und
10 je 1 mM Threonin und Leucin als einzige Aminosäuren, verwendet. Nach 48 Stunden wird die Cysteinakkumulation im Medium als Maß der Cysteininsensitivität der jeweiligen Plasmid-kodierten pflanzlichen SAT bestimmt.

2. Es wurden selektierte Kolonien in 200 ml LB-Vollmedium (Sambrook et al.,
15 (1989), vide supra) mit 100µg/ml Ampicillin wie oben beschrieben vermehrt. Die lösliche Proteinfraction wurde wie oben beschrieben nach Ultraschallbehandlung isoliert und die SAT-Aktivität im Standardtest nach Kredich and Becker (1971, vide supra) mit 10 µM Cystein im Vergleich zur Abwesenheit von Cystein bestimmt.

20 Die Plasmide selektierter Kolonien wurden erneut in MW1 wie oben transformiert und auf Wachstum in Abwesenheit von Cystein überprüft. Wachstum aller jeweils plattierten Zellen wurde als positive funktionale Komplementation interpretiert. Die cDNA-Insertionen der betreffenden Plasmide wurden daraufhin der DNA-Sequenzierung unterzogen.

25

Produktion von Cystein, Cystin und Glutathion in dem *E. coli*-Stamm MW1

Zur Herstellung von Cystein, Cystin und Glutathion in MW1 wurden 200ml
30 Schüttelkulturen mit M9-Medium, ergänzt mit IPTG (1mM), Ampicillin (100 µg/ml)

- 22 -

und den 18 proteinogenen Aminosäuren außer Cystein und Methionin mit einem Inoculum von 0,05 OD vom MW1 mit einem Plasmid mit SAT-kodierendem cDNA-Insert angeimpft. Die Cystein- und Glutathionbildung wurde im Kulturverlauf verfolgt. Die Werte nach 18 Stunden Wachstum sind in Tab. 2 dargestellt. Cystin
5 entstand als Oxidationsprodukt von Cystein im Medium und wurde nicht gesondert bestimmt.

Die Herstellung von Cystein und Cystin in dem Glutathion-defizienten Stamm JTG10 wurde genauso durchgeführt wie die Herstellung der Schwefel-haltigen
10 Verbindung in MW1.

Das Screenen nach Genen mittels funktionaler Komplementation ist stark von der Stabilität der entsprechenden Mutation in dem Wirtsorganismus abhängig. Dies ist insbesondere der Fall bei heterologer Komplementation zwischen entfernten Taxa
15 und dem Erfordernis einer großen Anzahl von Transformanten, wenn der Organismus, aus dem das die Mutation komplementierende Gen stammt, genetisch sehr komplex ist. Der oben beschriebene, für das effiziente Screening von SAT-cDNAs hergestellte mutierte *E. coli*-Stamm MW1 war den bereits bekannten *cysE-E. coli*-Mutanten EC1801 und JM39 dahingehend überlegen, dass MW1 keine
20 Reversion des Phänotyps zeigte. Dies bedeutet, dass das Screenen nach SAT-Genen aus heterologen Quellen ohne Beeinträchtigung durch unerwünschte genetische Ereignisse bei beliebigen Bedingungen durchgeführt werden kann. Die funktionelle Identität des Genotyps wurde verifiziert (i) biochemisch mittels Enzymassays, (ii) genetisch mittels DNA-DNA-Hybridisierung und (iii) physiologisch mittels
25 Komplementation mit bekannten cDNA-Klonen aus Pflanzen.

Der Stamm MW1 zeigte keine nachweisbare SAT-Aktivität (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: SAT enzymatische Aktivität in Rohextrakten von *E. coli* Wildtyp Stamm C600 und Mutante MW1

Enzymatische Aktivität [nmol / min mg Protein]	C600 (<i>cysE</i> ⁺ / <i>cysK</i> ⁺ / <i>cysM</i> ⁺)	MW1 (<i>cysE</i> ⁻ / <i>cysK</i> ⁺ / <i>cysM</i> ⁺)
SAT	2,50 +/- 0,41	0

5

Die Position der homologen Rekombination wurde durch Hybridisierung genomischer DNA des Wildtyp-Stammes C600 mit dem *cysE*-Gen als Sonde bestätigt. Restriktionsverdau mit EcoRV, welches außerhalb von *cysE* schneidet, und mit StuI, welches innerhalb des *cysE*-Gens schneidet, ergab ein 4,6 kb-Signal bzw.

- 10 7,4 kb- und 1,0 kb-Signale, was der Voraussage anhand der Karte des *E. coli*-Genoms bei 81,44 min. entspricht. Die Insertion der 2,2 kb-Gentamycin-Kassette würde das genomische EcoRV-Fragment auf 6,8 kb vergrößern. Dagegen führt eine interne EcoRV-Schnittstelle in der Kassette zu Signalen von 4,7 kb und 2,1 kb in der DNA-DNA-Hybridisierung, was die Position, Orientierung und Identität der
- 15 Insertion bestätigt. Abgesehen von der Gentamycinresistenz wurde die spezifische Identität des MW1-Stammes mittels Komplementation mit einer für SAT aus *Arabidopsis thaliana* kodierenden cDNA (Wirtz, Diplomarbeit 1998, Ruhr-Universität Bochum, Untersuchung der Cysteinbiosynthese durch Mutagenese der pflanzlichen Serin-Acetyltransferase) auf Minimalmedium ohne Cystein gezeigt. Die
- 20 SAT-Defizienz in dem Stamm MW1 wurde durch niedrige und mittelstarke Expressionsraten von SAT A unter Verwendung von Vektoren mit verschiedener Kopiezahl funktional komplementiert.

Die pflanzliche Cysteinsynthese wurde somit in *E. coli* ohne jeglichen endogenen

25 Hintergrund implementiert.

- 24 -

SAT7 und SAT1 aus Tabak entsprechen hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber Cystein der SAT-A aus *E. coli* mit einem I_{50} -Wert von ungefähr 45 μM (Noji et al. (1998) vide supra), wobei die Werte von SAT7 als auch SAT1 deutlich über der Inhibitionskonstante der bakteriellen SAT liegen (K_I 1,1 μM , Kredich et al. (1969) vide supra). SAT4 ist im Wesentlichen insensitiv gegenüber Cystein, d.h. ein I_{50} -Wert ist für SAT4 nicht messbar (vgl. Abbildung1). Eine derart vollständige Insensitivität gegenüber Cystein ist bislang noch nie für eine klonierte oder biochemisch isolierte SAT aus irgendeinem Organismus beschrieben worden.

10

Produktion von Cystein und Glutathion

Tabelle 2: Akkumulation von Cystein im Wachstumsmedium

15 *E. coli*-Zellen mit oder ohne pBS-SK-Plasmide mit Tabak-cDNA-Klonen für SAT wurden in supplementiertem M9-Minimalmedium ohne reduzierte Schwefelquelle kultiviert; die Cystein-Gehalte wurden nach 18 Stunden Wachstum, gerechnet von der Animpfung der Kultur, bestimmt.

20 Tabelle 2:

E. coli Stamm	Plasmid-Insert	Cystein [mg/l Medium]	Glutathion [mg/l Medium]
C600 (Kontrolle)	Kein SAT-Insert	0,064	0,190
MW1	SAT1	0,605	1,285
MW1	SAT4	0,971	0,705
MW1	SAT7	0,198	0,975
JTG10	Kein SAT-Insert	0,155	n.d.
JTG10	SAT1	0,768	n.d.

JTG10	SAT4	0,396	n.d.
JTG10	SAT7	0,169	n.d.

n.d. = nicht detektierbar

- 5 Der GSH-Gehalt im Medium von C600 und MW1 liegt im Wesentlichen in der Größenordnung der Cystein-Gehalte. Es ist davon auszugehen, dass auch Cystin im Medium vorhanden ist, da das Medium durch Schütteln kontinuierlich belüftet wird, wodurch die Cysteinoxidation gefördert wird.
- 10 Der Cystein-Gehalt im Medium ist für MW1, der die SAT-cDNA-Klone aus Tabak exprimiert, im Vergleich zu C600, der das Wildtyp-*cysE*-Gen trägt, ungefähr 10-fach erhöht. Ein weiterer 10-facher Anstieg in der Sekretion von Cystein wird durch Expression der Tabak-SAT in dem *E. coli*-Stamm JTG10 erreicht. Das Fehlen von Glutathion als Kontrollmittel für die Akkumulation von Cystein in der Bakterienzelle
- 15 resultiert somit in der Sekretion des Cysteins. Die Kombination von Feedback-insensitiven SAT-Enzymen mit Glutathion-defizienten Zelllinien erlaubt die Produktion von Cystein in 3- bis 10-fach höheren Mengen als im Stand der Technik unter Einsatz anderer Strategien bislang erreicht wurde (Daßler et al. (2000) vide supra; Takagi et al. (1999) vide supra; Nakamori et al. (1998) vide supra).

20

Abbildung

- Abbildung 1 zeigt die Hemmung pflanzlicher SAT-Enzyme durch Cystein. SAT1, SAT4 und SAT7 aus Tabak wurden in dem Stamm MW1 exprimiert und hinsichtlich
- 25 ihrer SAT-Aktivität bei steigenden Cystein-Konzentrationen untersucht.

- 26 -

Sequenzprotokoll

SEQ ID NO. 1

cDNA-Sequenz von SAT 1 aus *Nicotiana tabacum*

5

GCGGCCGCCTTTCTCTTTGTTTATCTCTCTCCTCCCTCGCCGCCACATATTC
TCCTACACACATTTTCGCTTCAATGTCCACTAATTTCTCGGATCACCACCA
CCCCTTTTCAAGAATGTAATCTCTCCTTGTAATAAACTCTCCACTTTCACA
ATAAGAGCTTGTTTACATTCTTGAGGCCCAAATTGATGATCATATCTA
10 CAACAAC TACTACTGCACTCCCAATTTCCCAAATCATGTTTCTC
AGACACCCATTTTCAGAAAAACAGCCAAAAACCAACAAGAACCATACAAT
TTTGGACAATTTTGCAAAGATGATGATTTGTGGCTAAAAATGCAAAAAG
AGGCAAGGTTAGATATTGAGCAAGAACCCCTTTTGTCAAATTACTATAAA
AATTCAATCTTGGCTCATGATTCTATAGAAAGTGCTTTAGCTAACCATCTT
15 TCAATGAAATTGAGCAATTTGAGTATTTCTAGTGAAACTCTATATGATCT
TTTCATGGGGGTGCTCACAGAGGATCAAGAATTGATTTTGTATGTTAATG
CTGATTTGATAGCTGTTAAAGAAAGAGATCCAGCTTGTATTAGTTATATA
CATTGTTTCTTGAATTTTAAAGGGTTTTTAGCATGTCAAGCACATAGAAT
AGCACATAAGTTATGGTCTAAAGGGAGAAAGATTTTAGCTTTAGTAATAC
20 AAAATAGAGTATGTGAAGTTTTTGCTGTGGATATTCATCCTGGAGCAAGA
ATTGGTAGAGGAATATTATTAGATCATGCAACTGGAGTTGTAATTGGTGA
GACAGCAATTATAGGAAATAATGTGTCAATTTTACATAATGTAACATTAG
GTGGAACCGGAAAAATGTGTGGTGATAGACATCCAAAAATTGGTGATGG
TGTATTAATAGGTGCAGGGACTTGTGTTCTTGGAATGTTAGAATTGAAA
25 ATGGTGCTAAAATTGGAGCTGGTTCTGTTGTGTTAATGGAAGTTCCTGCT
AGAACAAC TGTGTTGGAAATCCAGCTAGATTGATTGGTGGGAAAGCAA
ATCCAATTAAGCTTGATAAAATTCCTAGTTTGCCTATGGATCATACTTCAT
ATTTATCTGAGTGGTCTGATTATGTAATTTAGACCTAGGTTTGCTATGTAC
TGTGTACTTAGGCGGCCGCGCGGCCGC

30

- 27 -

SEQ ID NO. 2

Aminosäuresequenz der SAT 1 aus *Nicotiana tabacum*

5 RPPFSLFISLLPRRHIFS YTHFASMSTNFLGSPPLFKNVISPCNKLSTFTIRACL
HSCEPKIDDHIYNNYTKYCTPNFPNHVSQTPISEKQPKTNKNHTILDNFAKDD
DLWLKMQKEARLDIEQEPLLSNYYKNSILAHDSIESALANHLSMKLSNLSISS
ETLYDLFMGVLTEDQELIFDVNADLIAVKERDPACISYIHCFLNFKGFLACQA
HRIAHKLWSKGRKILALVIQNRVCEVFAVDIHPGARIGRGILLDHATGVVIGE
10 TAIIGNNVSILHNVTLGGTGKMCGRHPKIGDGVLLIGAGTCVLGNVRIENGA
KIGAGSVVLMVPARTTAVGNPARLIGGKANPIKLDKIPSLPMDHTSYLSEW
SDYVI

15 SEQ ID NO. 3

cDNA-Sequenz von SAT 4 aus *Nicotiana tabacum*

GCGGCCGCAACTCCTCCTACAAATCCACTTTCTCGCGATCCAAACAAGCC
CCAAATCGACAATCATGTCTATAACTACGTAAATTCTGTCTGACCCAGTT
20 TCCCTGAGCTTGTTTCTTGCGCACCCATTCTGAAAAGAACTCCAAAATC
GGTCGTAACGAAGAGGAAGACGATTTGTGGCTAAAAATGAAAGATGAGG
CTAGATCAGACATTGATCAAGAACCCATTTTGTCTACTTACTACATAACT
TCAATCTTGGCTCATGATTCTATGGAAAGGGCTTTAGCTAATCATCTTTCA
ATGAAATTGAGTAATTCAAGTCTTCCTAGCAGCACTTTGTATGATCTTTTC
25 CTAGGGGTGCTCACAGAGGATTGCTCACAAGATATAATTAAAGCTGTTAT
AGCTGATTTAAGGGCAGTTAAAGAAAGGGACCCAGCTTGTATTAGTTATG
TACACTGTTTCTTGAATTTTAAAGGGTTTTTAGCATGTCAAGCTCATAGGA
TTGCACATAAATTATGGTCAAATGGTAGGCAAATTTTGGCACTTTTGATA
CAAAACAGGGTATCTGAAGTTTTTGCTGTCGACATACATCCTGGTGCTAA
30 AATTGGTAAAGGGATTTTACTTGATCATGCTACTGGAGTTGTCGTTGGTG

- 28 -

AAACTGCTGTGATTGGAAATAATGTGTCAATTTTGCATAACGTGACATTG
GGTGGAACTGGCAAATATCTGGGGATAGACATCCTAAAATTGGTGATG
GGGTTTAAATTGGTGCTGGAACCTTGTGTTCTTGGAAATGTTATAATTGAA
GATGGAGCTAAAATTGGGGCAGGGTCCGTGGTGCTGAAGAAAGTTCCGG
5 CGAGGACTACCGCCGTTGGGAATCCGGCGAGGTTGCTCGGAGGGAAGGA
AAATCCAAAGAACTTGATAAGATTCCTAGTTTGACCATGGACCATACAT
ATGAGTGGTCTGATTATGTAATTTAGAGTAATAACAACCTTTTACTTTGTTT
ACTACTGTTTTAGGTTTTTATTAGATTAAGTGAAACGAAGGGAATTCTTG
GCCGTAACCGATAAAGTTGCTGCTATGTGATTAAGAAGGTTACGAAGTTC
10 CGAACTGTAANAAACAACCTTTTGCAAAAAAATACNGGTAAGAATTGCG
TACAATAAACCTTGNGGTCTGACCCTTNCCTCAATCCCCCCCCATAGCCG
GGGAGTTTTATTGCACCCAAAANGTCATTTTTTANTAAAATTAAGTGGA
GATGCCCTCGAGGAATTTTAGTTGCAGGGAGAATATTTCTTGAGTGGA
GATGTTGTACAAGCCATTTACTTCTATGGTAACTGGTTTATATTAAGAGA
15 TTATTGTACTAGATTTCTTGCTAGAGTAAACGGTTCAAATGCAATCTGAC
TAAGATTGAGGCGGCCGC

SEQ ID NO. 4

20 Aminosäuresequenz von SAT 4 aus *Nicotiana tabacum*

AAATPPTNPLSRDPNKPQIDNHVYNYVKFCRPSFPELVSCAPIPEKNSKIGRN
EEEDDLWLKMKDEARSDIDQEPILSTYYTTSILAHDSMERALANHLSMKLSN
SSLPSSTLYDLFLGVLTEDCSQDIKAVIADLRAVKERDPACISYVHCFLNFKG
25 FLACQAHRIAHLWSNGRQILALLIQNRVSEVFAVDIHPGAKIGKGILLDHAT
GVVVGETAVIGNNVSIHNVTLGGTGKISGDRHPKIGDGVLIAGTCVLGNV
IIEDGAKIGAGSVVLKKVPARTTAVGNPARLLGGKENPKKLDKIPSLTMDHT
YEWSDYVI

30

- 29 -

SEQ ID NO. 5

cDNA-Sequenz von SAT 7 aus *Nicotiana tabacum*

CGCGGCCGCGGACGTTATCCGATATGCCAGCCGGAGAATACCGCAATGC
5 CACACCGGCGACACCACATCCACCGACAGACACGGCGGAAGAATCCACA
TGGCTATGGACACAAATCAAAGCCGAAGCTCGGCGCGACGCCGAAGCCG
AGCCGGCATTAGCCAGCTACTTATACTCAACTATACTCTCTCACTCTTCGC
TTGAACG TTCGCTCTCTTTCCATTTGGGAAACAAGCTTTGTTCTTCCACGC
TCTTATCCACACTCCTTTATGATCTGTTTCTCAATACTTTCTCTAATGAAC
10 CTGAGCTACGCGCCGCGCTTCCGCTGACCTACTCGCTGCTCGTTACCGG
GACCCTGCTTGTGTTTCATTCTCTCATTGTTTGCTTAAC TACAAAGGTTTC
CTTGCTTGT CAGGCACATCGAGTAGCCCAACAAGCTTTGGACTCAATCCCG
AAGGCCACTTGCTCTGGCACTTCAATCCCGAATCTCTGATGTTTTTGCTGT
TGACATTCATCCAGCTGCCAAGATCGGTAAAGGTATCCTCTTTGATCATG
15 CAACAGGAGTGGTGGTTGGCGAGACTGCAGTTATTGGAAACAACGTGTC
AATTCTTCACCATGTAACCTTAGGAGGGGACTGGTAAGATTGGTGGTGACC
GGCACCCTAAGATTGGGGATGGTGTGCTCATAGGTGCAGGTGCCACAAT
ATTGGGCAACGTGAGGATTGGTGAGGGGGCCAAGATTGGCGCTGGATCA
GTGGTATTGATTGACGTGCCACCACGGACAAC TGCAGTTGGGAATCCAGC
20 AAGGTTGGTTGGAGGGAAGGAACAACCAACTAAGCATGAGGAATGTCCC
GGAGAGAGTATGGATCATA CATCTTTCA TTTCTGAATGGTCTGATTACAT
CATATGACTTGCATCCCTCATGTATGCTATATCTGCAAAGTGAACAAGAA
GTCGTCTACGAACCTAGCAGAGAGGACAAAGGTTCAATCTTAACGCTACT
GACTGT TAAACATGCTCTTTGTGCTAGTCCAACAGTCCAAGTGCAAAGA
25 ACTTATATCTATCTTTTTTTTTTCCCAATAGTCTTTCTGTTTTTCTACATTTA
CATGCTGTCTGAGAGGGTTGAAGGCTCTTGTTTTTATGCAGAGATTTCTG
CTTGAGT CGCCTTACAGCAAGTTCCCTTTGATGGCACAATATATAAGT
AGTATGTATTATGAGTTCAGTATCTACTCGTTGCTGGTCTTCCTAGGCCTT
AAAACTGGTGAAAATTA ACTGTACGAAGTACTGGCCTATTATTATTGGT
30 ATCATTATTGCTGCGGGCC

- 30 -

SEQ ID NO. 6

Aminosäuresequenz von SAT 7 aus *Nicotiana tabacum*

5

RPPTLSDMPAGEYRNATPATPHPPTDTAEESTWLWTQIKAEARRDAEAEPAL
ASYLYSTILSHSSLERSLSFHLGNKLCSSSTLLSTLLYDLFLNTFSNEPELRAAA
SADLLAARYRDPACVSFSHCLLNYKGFLACQAHRVAHKLWTQSRRLALAL
QSRISDVFAVDIHPAAKIGKGILFDHATGVVVGETAVIGNNVSIHHVTLGGT
10 GKIGGDRHPKIGDGVIGAGATILGNVRIGEGAKIGAGSVVLIDVPPRTTAVG
NPARLVGGKEQPTKHEECPGESMDHTSFISEWSDYII

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung und Gewinnung von Schwefel-haltigen
5 Verbindungen wie Cystein, Cystin und Glutathion in einem Mikroorganismus,
der eine heterologe, für eine Cystein-insensitive Serin-Acetyltransferase
kodierende DNA-Sequenz enthält und Glutathion-defizient ist.

2. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die DNA-Sequenz pflanzlichen
10 Ursprungs ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei es sich bei dem
Mikroorganismus um einen *E. coli*-Stamm handelt.

4. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der
15 Mikroorganismus im ersten Glutathionsyntheseschritt inaktiviert ist.

5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die
DNA-Sequenz ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus SEQ ID NO. 1,
20 SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 5, einer für eine SAT kodierenden Sequenz, die zu
SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 3 oder SEQ ID NO. 5 innerhalb der kodierenden
Region eine Identität von mindestens 80% aufweist.

6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die
25 DNA-Sequenz in einem Verfahren zur Auffindung von DNA-Sequenzen, die für
Proteine mit der enzymatischen Aktivität einer Cystein-insensitiven Serin-
Acetyltransferase kodieren, aufgefunden wurde, worin die Auffindung durch
Expression der DNA-Sequenzen und damit einhergehende funktionale
Komplementation in einem Bakterienstamm erfolgt, dessen endogene Serin-
30 Acetyltransferase-Aktivität gestört ist.

- 32 -

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei der Bakterienstamm, dessen SAT-Aktivität gestört ist, ein *Escherichia coli*-Bakterienstamm ist, der eine Mutation im *cysE*-Gen aufweist (*cysE*).

5

8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Cystein-insensitive Serin-Acetyltransferase einen I_{50} -Wert von mindestens 30 μ M aufweist.

10

9. Verwendung von Cystein-insensitiven Serin-Acetyltransferase-Genen, die für Serin-Acetyltransferasen kodieren, die einen I_{50} -Wert von mindestens 30 μ M aufweisen, zur Herstellung und Gewinnung von Schwefel-haltigen Verbindungen wie Cystein, Cystin und Glutathion in Glutathion-defizienten Mikroorganismen.

15

10. Verwendung nach Anspruch 9, wobei das Serin-Acetyltransferase-Gen pflanzlichen Ursprungs ist.

20

11. Verfahren zur Auffindung von DNA-Sequenzen, die für Proteine mit der enzymatischen Aktivität einer Cystein-insensitiven Serin-Acetyltransferase kodieren, dadurch gekennzeichnet, dass die Auffindung durch Expression der DNA-Sequenzen und damit einhergehende funktionale Komplementation in einem Bakterienstamm erfolgt, dessen endogene Serin-Acetyltransferase-Aktivität gestört ist.

25

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei der Bakterienstamm ein *Escherichia coli*-Bakterienstamm ist und eine Mutation im *cysE*-Gen aufweist (*cysE*).

- 33 -

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, wobei es sich um pflanzliche DNA-Sequenzen handelt.

5 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, wobei die Cystein-insensitive Serin-Acetyltransferase einen I_{50} -Wert von mindestens 30 μ M aufweist.

10 15. DNA-Sequenz, die für ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Serin-Acetyltransferase aus *Nicotiana tabacum* kodiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

a) DNA-Sequenzen, die eine Nukleotidsequenz umfassen, die die in SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 4 oder SEQ ID NO. 6 angegebene

Aminosäuresequenz oder Fragmente davon kodieren,

15 b) DNA-Sequenzen, die die in SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 3 oder SEQ ID NO. 5 angegebene Nukleotidsequenz oder Teile davon umfassen,

c) DNA-Sequenzen, die eine Nukleotidsequenz, die mit einem komplementären Strang der Nukleotidsequenz von a) oder b) hybridisiert, oder Teile dieser Nukleotidsequenz umfassen,

20 d) DNA-Sequenzen, die eine Nukleotidsequenz, die zu einer Nukleotidsequenz von c) degeneriert ist, oder Teile dieser Nukleotidsequenz umfassen,

e) DNA-Sequenzen, die ein Derivat, Analog oder Fragment einer Nukleotidsequenz von a), b), c) oder d) darstellen.

25

Abbildung 1

Hemmung pflanzlicher SATs durch Cystein

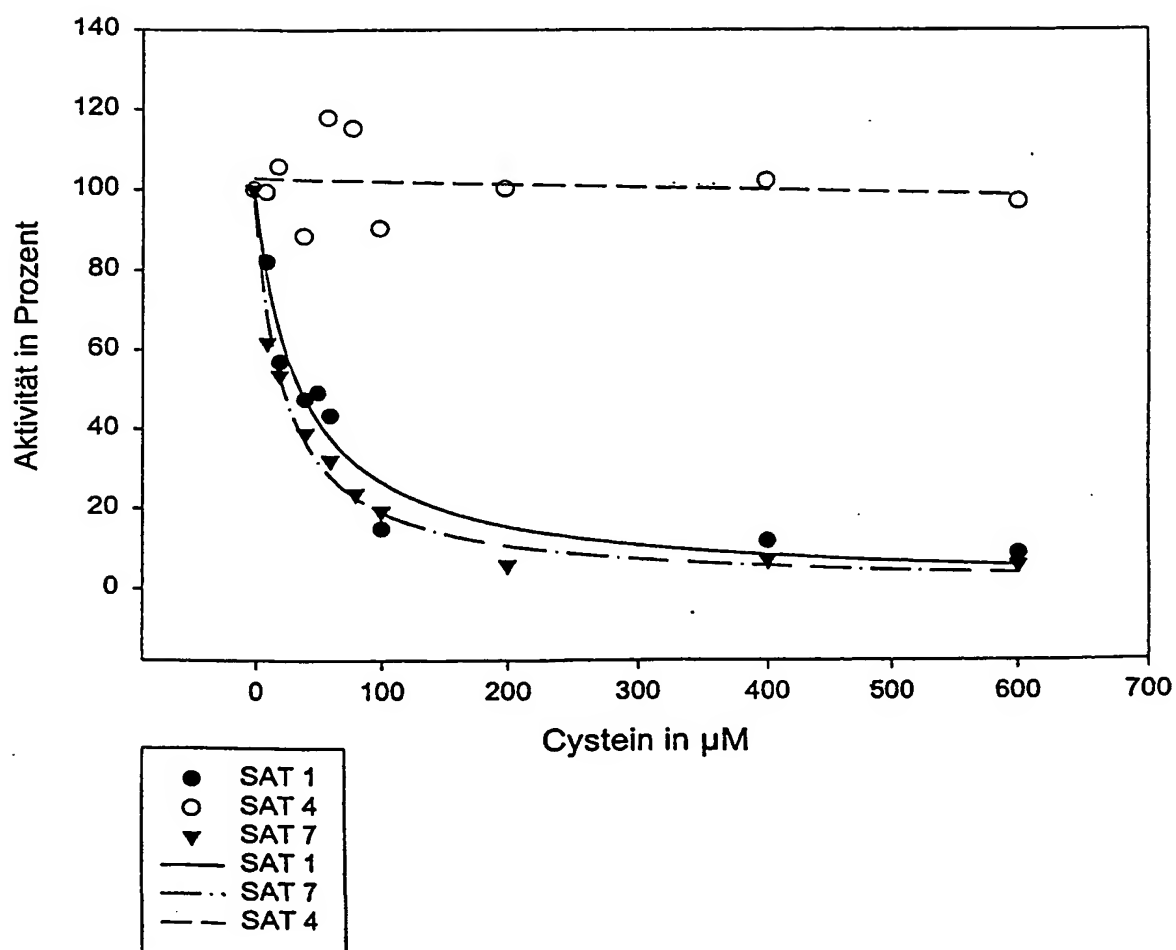


Abbildung 2

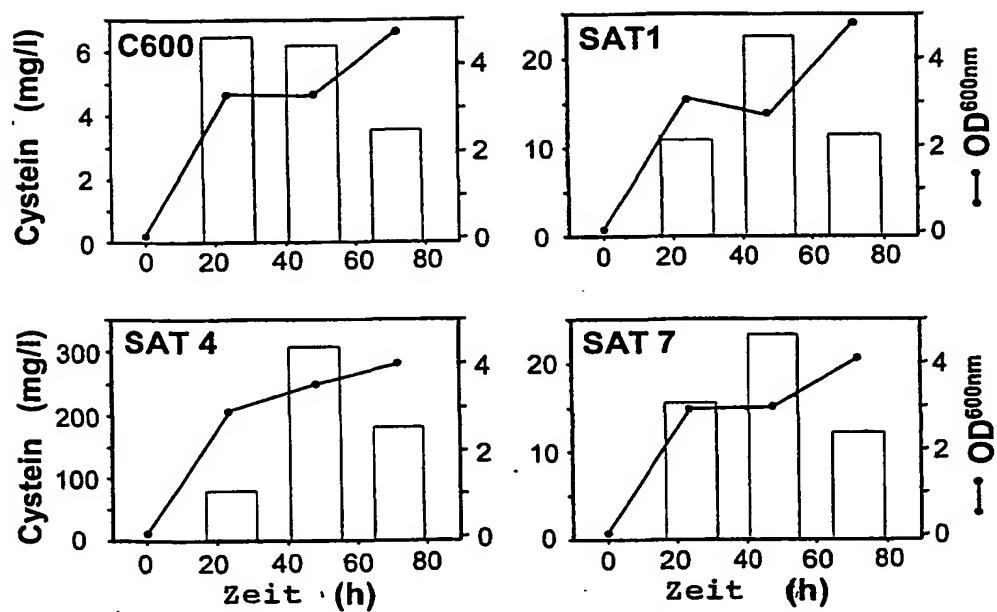
1 -----MATCIDTCRTG-----NTQDDSRFCCKNFFRPG-ESVN---RKIHHT AT1g555920
1 -----MNDELPPESGFEVYAKGTHKSEFDS AT2g17640
1 MLPVTSRRHFTMSLYMLRSSPHINHSFLLPSFVSSKFKHHTLSPPPPPMAACIDTCRTGKQIISPRDSSKHHDDSGFRYMYFDRSSFNQTKTLHTR AT3g13110
1 -----MACINGENRDFSSSSLSLPMIVSR-----NFSARDDGETDEFFPERIFPVYARGTQTNVPADP AT4g35640
1 -----MSTNFLGSPPLFKN-----MPAGELRHQSPSKESKLSVTSQDEAEASAAIS AT5g56760
1 -----VSPCNKLSFTTIRACHSCEPKIDD-----HIYNNYTKYCTPNFPHVSQTPISEKQPKTNKH Tabak1
1 -----MPAGEYRNATP-----ATPHP Tabak7
1 -----MSCE E. coli
1 -----

41 QIEDD-----DDVWIKMLEEAKSDVKQEPILSNYYYASITSHRSLESALAHLSVKLSNLPNSNLFELFISVLEES--PEIIESTKQDLIAVKERDPACISY AT1g555920
27 NLLDPRS-----DPIWDAIRREEAKLEAEKEPILSSFLYAGILAHDCLEQALGFVLANRLQNPTLLATQLLDIFVGVMMHD--KGIQSSIRHDLQAFKORDPACLSY AT2g17640
111 PLLLEDLR-----DAEVDVWAKIREEAKSDIAKEPIVSAYHASIVQSRSLEAALANTLSVKLSNLPNSNLFELFISVLOQN--PDIVESVKLDLLAVKERDPACISY AT3g13110
61 VLLDFTN-----SSYDPIWDSIREEAKLEAEKEPILSSFLYASILSHDCLEQALSFVLANRLQNPTLLATQLMDIFCNVMMHD--RGIQSSIRLDVQAFKORDPACLSY AT4g35640
35 AAAA-----DAEAGLWTOIKAEARRDAEAEALASYLYSTILSHSLSERSISFHLGNKCSSTLLSTLLYDLFNTFFSSD--PSLRNATVADLRAARVRDPACISF AT5g56760
76 TILDN-----FAKDDDLWLKMQKEARLDIEQEPILSNYYKNSILAHDSIESALANHLMSKLSNLSISSETLYDLFMGVLTED--QELIFDVNADLIAVKERDPACISY Tabak1
1 -----MKDEARSDIDQEPILSTYYITTSILAHDSMERALANHLMSKLSNLSLPSSTLYDLFLGVLTEDSQDIIKAVIADLRAVKERDPACISY Tabak4
17 PDDT-----AEESTWLWTOIKAEARRDAEAEALASYLYSTILSHSLSERSLSFHLGNKCSSTLLSTLLYDLFNTFFSNE--PELRAAASADLLAARYRDPACVSF Tabak7
5 ELEI-----VWNNIKAEARTLADCEPMLASFYHATLLKHENLGSALSYMLANKLSSPIMPALAIAREVVEEAYAAD--PEMIASAAACDIQAVRTRDPADV KY E. coli

138 VHCFLGKGFACQAHRIAHTLWKQNRKIVALLIQNRVSESAVDIHPGAKIGKILLDHATGVVIGETAVVGDVNSILHGVTLGGTGK-QSGDRHPKIGDGVILGAGSC AT1g555920
126 SSAILHLKGHALQAYRVAHKLNWEGRKLLALALQSRISSEVFGIDHPAARIIGEGILLDHGTGVVIGETAVIGNVSIHLHGVTLGGTGK-ETGDRHPKIGEGALLGACVT AT2g17640
215 VHCFLHFKGFACQAHRIAHELTWQDRKILALLIQNRVSEAFVDFHPGAKIGTGILLDHATAIVIGETAVVGNVNSILHNVTLGGTGK-QCGDRHPKIGDGVILGAGTC AT3g13110
163 SSAILHLKGYLALQAYRVAHKLNWQGRKLLALALQSRVSEVR-----TAVIGDRVSIHLHGVTLGGTGK-ETGDRHPNIGDGVILGAGTC AT4g35640
135 SHCLLNKYGFLAIQAHRVSHKLTQSRKPLALALHRSISDVFAVDIHPAAKIGKILLDHATGVVIGETAVIGNVSIHLHNVTLGGTGK-ACGDRHPKIGDGVILGAGTC AT5g56760
177 IHCFLNFKGFACQAHRIAHLKWSKGRKILALVIONRVSEVFAVDIHPGAKIGKILLDHATGVVIGETAVIGNVSIHLHNVTLGGTGK-MCGDRHPKIGDGVILGAGTC Tabak1
89 VHCFLNFKGFACQAHRIAHLKWSNGRQILALLIQNRVSEVFAVDIHPGAKIGKILLDHATGVVIGETAVIGNVSIHLHNVTLGGTGK-ACGDRHPKIGDGVILGAGTC Tabak4
117 SHCLLNKYGFLACQAHRVAHKLTQSRRLALALQSRISDVFAVDIHPAAKIGKILLDHATGVVIGETAVIGNVSIHLHNVTLGGTGK-IGGDRHPKIGDGVILGAGTC Tabak7
99 STPLLYLKGFLALQAYRIGHWLMNQRRALAI FLQNVSVTFQVDIHPAAKIGRIGIMLDHATGIVVIGETAVIENDVSILOSVTLGGTGK-SGGDRHPKIREGVMIGAGAK E. coli

247 ILGNITIGEGAKIGSGSVVVKDVPARTTAVGNPARLIGGKENPRK-HDKIPCLTMDQTSYLTSEWSDYVI AT1g555920
235 ILGNISIGAGAMVAGSLVLKDVPSHVVAGNPAKILRVMEEQDPS-----LAMKHDAKTEFRHVADGYKGAQSNGPSLSAGDTEKHTNSTS AT2g17640
324 ILGNITIGEGAKIGAGSVLKDVPPTTAVGNPARLIGGKDNPKT-HDKIPGLTMDQTSHISEWSDYVI AT3g13110
246 ILGNIKIGAGAMVAGSLVLKDVPSHVMAGNPAKILGFVDEQDPS-----MTMEHGES AT4g35640
244 ILGNVKGAGAKVAGSVLIDVPCRTTAVGNPARLVGGKEKPTIHDEECPEGESMDHTSFISEWSDYII AT5g56760
286 VIGNVRIENGAKIGAGSVLMEVPARTTAVGNPARLIGGKANPIK-LDKIPSLPMDHTSYLTSEWSDYVI Tabak1
198 VIGNVIEEDGAKIGAGSVLKKVPARTTAVGNPARLIGGKENPKK-LDKIPSLTMDHTSYLTSEWSDYVI Tabak4
226 ILGNVRIEGAKIGAGSVLIDVPPRTTAVGNPARLVGGKEQPTK-HEECPEGESMDHTSFISEWSDYII Tabak7
208 ILGNIEVGRGAKIGAGSVLQVPVPHHTTAAGVPARIVGKPSDKPSMDM--DQHFNGINHTFEYGDGI E. coli

Abbildung 3



SEQUENZPROTOKOLL

<110> IPK - Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanz

<120> Verfahren zur fermentativen Herstellung von Cystein,
Cystin und Glutathion

<130> I 7210

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1181

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<400> 1

```

gcgggcgcct ttctctttgt ttatctctct cctccctcgc cgccacatat tctcctacac 60
acatttcgct tcaatgtcca ctaatttcct cggatcacca ccaccccttt tcaagaatgt 120
aatctctcct tgtaataaac tctccacttt cacaataaga gcttgtttac attcttgtga 180
gccccaaatt gatgatcata tctacaacaa ctacactaaa tactgcactc ccaatttccc 240
aaatcatgtt tctcagacac ccatttcaga aaaacagcca aaaaccaaca agaaccatac 300
aattttggac aattttgcaa aagatgatga tttgtggcta aaaatgcaaa aagaggcaag 360
gttagatatt gagcaagaac cccttttgct aaattactat aaaaattcaa tcttggctca 420
tgattctata gaaagtgtt tagctaacca tctttcaatg aaattgagca atttgagtat 480
ttctagttaa actctatatg atcttttcat ggggggtgtc acagaggatc aagaattgat 540
ttttgatgtt aatgctgatt tgatagctgt taaagaaaga gatccagctt gtattagtta 600
tatacattgt ttcttgaatt ttaaagggtt tttagcatgt caagcacata gaatagcaca 660
taagttatgg tctaaagggg gaaagatttt agcttttagt atacaaaata gagtatgtga 720
agtttttgct gtggatatct atcctggagc aagaattggt agaggaatat tattagatca 780
tgcaactgga gttgtaattg gtgagacagc aattatagga aataatgtgt caattttaca 840
taatgtaaca ttaggtggaa ccggaaaaat gtgtggtgat agacatccaa aaattggtga 900
tggtgtatta ataggtgcag ggacttgtgt tcttggaaat gttagaattg aaaatggtgc 960
taaaattgga gctggttctg ttgtgttaat ggaagttcct gctagaacaa ctgctggttg 1020
aatccagct agattgattg gtgggaaagc aaatccaatt aagcttgata aaattcctag 1080
tttgctatg gatcatactt catatttatt tgagtgggtc gattatgtaa tttagacct 1140
ggtttgctat gtactgtgta cttaggcggc cgcgcggccg c 1181

```

<210> 2

<211> 377

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 2

```

Arg Pro Pro Phe Ser Leu Phe Ile Ser Leu Leu Pro Arg Arg His Ile
 1             5             10            15

Phe Ser Tyr Thr His Phe Ala Ser Met Ser Thr Asn Phe Leu Gly Ser
 20             25            30

Pro Pro Pro Leu Phe Lys Asn Val Ile Ser Pro Cys Asn Lys Leu Ser
 35             40            45

Thr Phe Thr Ile Arg Ala Cys Leu His Ser Cys Glu Pro Lys Ile Asp
 50             55            60

Asp His Ile Tyr Asn Asn Tyr Thr Lys Tyr Cys Thr Pro Asn Phe Pro

```

```

      65              70              75              80
Asn His Val Ser Gln Thr Pro Ile Ser Glu Lys Gln Pro Lys Thr Asn
      85              90              95

Lys Asn His Thr Ile Leu Asp Asn Phe Ala Lys Asp Asp Asp Leu Trp
      100             105             110

Leu Lys Met Gln Lys Glu Ala Arg Leu Asp Ile Glu Gln Glu Pro Leu
      115             120             125

Leu Ser Asn Tyr Tyr Lys Asn Ser Ile Leu Ala His Asp Ser Ile Glu
      130             135             140

Ser Ala Leu Ala Asn His Leu Ser Met Lys Leu Ser Asn Leu Ser Ile
      145             150             155

Ser Ser Glu Thr Leu Tyr Asp Leu Phe Met Gly Val Leu Thr Glu Asp
      165             170             175

Gln Glu Leu Ile Phe Asp Val Asn Ala Asp Leu Ile Ala Val Lys Glu
      180             185             190

Arg Asp Pro Ala Cys Ile Ser Tyr Ile His Cys Phe Leu Asn Phe Lys
      195             200             205

Gly Phe Leu Ala Cys Gln Ala His Arg Ile Ala His Lys Leu Trp Ser
      210             215             220

Lys Gly Arg Lys Ile Leu Ala Leu Val Ile Gln Asn Arg Val Cys Glu
      225             230             235             240

Val Phe Ala Val Asp Ile His Pro Gly Ala Arg Ile Gly Arg Gly Ile
      245             250             255

Leu Leu Asp His Ala Thr Gly Val Val Ile Gly Glu Thr Ala Ile Ile
      260             265             270

Gly Asn Asn Val Ser Ile Leu His Asn Val Thr Leu Gly Gly Thr Gly
      275             280             285

Lys Met Cys Gly Asp Arg His Pro Lys Ile Gly Asp Gly Val Leu Ile
      290             295             300

Gly Ala Gly Thr Cys Val Leu Gly Asn Val Arg Ile Glu Asn Gly Ala
      305             310             315             320

Lys Ile Gly Ala Gly Ser Val Val Leu Met Glu Val Pro Ala Arg Thr
      325             330             335

Thr Ala Val Gly Asn Pro Ala Arg Leu Ile Gly Gly Lys Ala Asn Pro
      340             345             350

Ile Lys Leu Asp Lys Ile Pro Ser Leu Pro Met Asp His Thr Ser Tyr
      355             360             365

Leu Ser Glu Trp Ser Asp Tyr Val Ile
      370             375

```

<210> 3

<211> 1417

<212> DNA

<213> *Nicotiana tabacum*

<400> 3

```

gccccgcaa ctccctctac aaatccactt tctcgcgac caaacaagcc ccaaatecgac 60
aatcatgtct ataactacgt taaattctgt cgacccagtt tccctgagct tgtttcttgc 120
gcacccattc ctgaaaagaa ctccaaaatc ggtcgtaacg aagaggaaga cgatttcttg 180
ctaaaaatga aagatgaggg tagatcagac attgatcaag aacccatttt gtctacttac 240
tacataactt caatcttggc tcatgattct atggaaaggg ctttagctaa tcatctttca 300
atgaaattga gtaattcaag tcttcctagc agcactttgt atgatctttt cctaggggtg 360
ctcacagagg attgctcaca agatataatt aaagctgtta tagctgattt aagggcagtt 420
aaagaaaggg acccagcttg tattagttat gtacactgtt tcttgaattt taaaggggtt 480
ttagcatgtc aagctcatag gattgcacat aaattatggt caaatggtag gcaaattttg 540
gcacttttga tacaaaacag ggtatctgaa gtttttgctg tcgacataca tcctgggtgt 600
aaaattggta aagggatttt acttgatcat gctactggag ttgtcgttgg tgaaactgct 660
gtgattggaa ataatgtgtc aattttgcat aacgtgacat tgggtggaac tggcaaaata 720
tctggggata gacatcctaa aattgggtgat ggggttttaa ttgggtgctg aacttgtgtt 780
cttggaatg ttataattga agatggagct aaaattgggg caggggtccg ggtgctgaag 840
aaagttccgg cgaggactac cgccgttggg aatccggcga gggtgctcgg aggggaaggaa 900
aatccaaaga aacttgataa gattcctagt ttgaccatgg accatacata tgagtgggtc 960
gattatgtaa ttagagtaa taacaacttt tactttgttt actactgttt taggttttta 1020
ttagattaag tgaaacgaag ggaattcttg gccgtaaccg ataaagttgc tgctatgtga 1080
ttaagaaggt tacgaagttc cgaactgtaa naaacaacct tttgcaaaaa aatacnngta 1140
agaattgctg acaataaacc cttgnngtct gacccttntc caatcccccc ccatagccgg 1200
ggagttttat tgcacccaaa aangtcattt ttantaaaa ttaagtggag atgcccctcg 1260
aggaatttta gttgcagggg gaatatttcc ttgagtggag atgttgtaga agccatttac 1320
ttctatggta actggtttat attaagagat tattgtacta gatttcttgc tagagtaaac 1380
ggttcaaatt caatctgact aagattgagg cggccgc 1417

```

<210> 4

<211> 324

<212> PRT

<213> *Nicotiana tabacum*

<400> 4

```

Ala Ala Ala Thr Pro Pro Thr Asn Pro Leu Ser Arg Asp Pro Asn Lys
 1                      5                      10                      15

Pro Gln Ile Asp Asn His Val Tyr Asn Tyr Val Lys Phe Cys Arg Pro
          20                      25                      30

Ser Phe Pro Glu Leu Val Ser Cys Ala Pro Ile Pro Glu Lys Asn Ser
          35                      40                      45

Lys Ile Gly Arg Asn Glu Glu Glu Asp Asp Leu Trp Leu Lys Met Lys
 50                      55                      60

Asp Glu Ala Arg Ser Asp Ile Asp Gln Glu Pro Ile Leu Ser Thr Tyr
 65                      70                      75                      80

Tyr Ile Thr Ser Ile Leu Ala His Asp Ser Met Glu Arg Ala Leu Ala
          85                      90                      95

Asn His Leu Ser Met Lys Leu Ser Asn Ser Ser Leu Pro Ser Ser Thr
          100                      105                      110

Leu Tyr Asp Leu Phe Leu Gly Val Leu Thr Glu Asp Cys Ser Gln Asp
          115                      120                      125

Ile Ile Lys Ala Val Ile Ala Asp Leu Arg Ala Val Lys Glu Arg Asp
          130                      135                      140

Pro Ala Cys Ile Ser Tyr Val His Cys Phe Leu Asn Phe Lys Gly Phe

```


145 150 155 160
 Leu Ala Cys Gln Ala His Arg Ile Ala His Lys Leu Trp Ser Asn Gly
 165 170 175
 Arg Gln Ile Leu Ala Leu Leu Ile Gln Asn Arg Val Ser Glu Val Phe
 180 185 190
 Ala Val Asp Ile His Pro Gly Ala Lys Ile Gly Lys Gly Ile Leu Leu
 195 200 205
 Asp His Ala Thr Gly Val Val Val Gly Glu Thr Ala Val Ile Gly Asn
 210 215 220
 Asn Val Ser Ile Leu His Asn Val Thr Leu Gly Gly Thr Gly Lys Ile
 225 230 235 240
 Ser Gly Asp Arg His Pro Lys Ile Gly Asp Gly Val Leu Ile Gly Ala
 245 250 255
 Gly Thr Cys Val Leu Gly Asn Val Ile Ile Glu Asp Gly Ala Lys Ile
 260 265 270
 Gly Ala Gly Ser Val Val Leu Lys Lys Val Pro Ala Arg Thr Thr Ala
 275 280 285
 Val Gly Asn Pro Ala Arg Leu Leu Gly Gly Lys Glu Asn Pro Lys Lys
 290 295 300
 Leu Asp Lys Ile Pro Ser Leu Thr Met Asp His Thr Tyr Glu Trp Ser
 305 310 315 320
 Asp Tyr Val Ile

<210> 5

<211> 1320

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<400> 5

cgcgccgccc gacgttatcc gatatgccag ccggagaata ccgcaatgcc acaccggcga 60
 caccacatcc accgacagac acggcggaag aatccacatg gctatggaca caaatcaaag 120
 ccgaagctcg gcgcgacgcc gaagccgagc cggcattagc cagctactta tactcaacta 180
 tactctctca ctcttcgctt gaacgttcgc tctctttcca tttgggaaac aagctttggt 240
 cttccacgct cttatccaca ctcccttatg atctgtttct caatactttc tctaataaac 300
 ctgagctacg cgccgcgcgt tccgctgacc tactcgctgc tcgttaccgg gaccctgctt 360
 gtgtttcatt ctctcattgt ttgcttaact acaaagggtt ccttgcttgt caggcacatc 420
 gagtagccca caagctttgg actcaatccc gaaggccact tgctctggca cttcaatccc 480
 gaatctctga tgtttttgct gttgacattc atccagctgc caagatcggg aaaggatatcc 540
 tctttgatca tgcaacagga gtggtggttg gcgagactgc agttattgga aacaacgtgt 600
 caattcttca ccatgtaacc ttaggagggg ctggttaagat tgggtgtgac cggcacccta 660
 agattggggg tgggtgtgctc atagggtgcag gtgccacaat attgggcaac gtgaggattg 720
 gtgagggggc caagattggc gctggatcag tgggtattgat tgacgtgcc aacacggaca 780
 ctgcagttgg gaatccagca aggttggttg gaggggaagga acaaccaact aagcatgagg 840
 aatgtcccgg agagagtatg gatcatacat ctttcatttc tgaatggtct gattacatca 900
 tatgacttgc atccctcatg tatgctatat ctgcaaagtg aacaagaagt cgtctacgaa 960
 cctagcagag aggacaaagg ttcaatctta acgctactga ctgttaaaca tgctctttgt 1020
 gctagtccaa cagtccaaag tgcaaagaac ttatatctat cttttttttt cccaatagtc 1080
 tttctgtttt tctacattta catgctgtct gagagggttg aaggctcttg tttttatgca 1140
 gagatttctg cttggagtcg ccttacagca agttcccttt gatggcacia atatataagt 1200
 agtatgtatt atgagttcag tatctactcg ttgctggtct tcctaggcct taaaaactgg 1260

tgaaaattaa ctgtacgaag tactggccta ttattattgg tatkattatt gctgcgggcc 1320

<210> 6

<211> 300

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 6

Arg	Pro	Pro	Thr	Leu	Ser	Asp	Met	Pro	Ala	Gly	Glu	Tyr	Arg	Asn	Ala	1	5	10	15
Thr	Pro	Ala	Thr	Pro	His	Pro	Pro	Thr	Asp	Thr	Ala	Glu	Glu	Ser	Thr	20	25	30	
Trp	Leu	Trp	Thr	Gln	Ile	Lys	Ala	Glu	Ala	Arg	Arg	Asp	Ala	Glu	Ala	35	40	45	
Glu	Pro	Ala	Leu	Ala	Ser	Tyr	Leu	Tyr	Ser	Thr	Ile	Leu	Ser	His	Ser	50	55	60	
Ser	Leu	Glu	Arg	Ser	Leu	Ser	Phe	His	Leu	Gly	Asn	Lys	Leu	Cys	Ser	65	70	75	80
Ser	Thr	Leu	Leu	Ser	Thr	Leu	Leu	Tyr	Asp	Leu	Phe	Leu	Asn	Thr	Phe	85	90	95	
Ser	Asn	Glu	Pro	Glu	Leu	Arg	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Asp	Leu	Leu	Ala	100	105	110	
Ala	Arg	Tyr	Arg	Asp	Pro	Ala	Cys	Val	Ser	Phe	Ser	His	Cys	Leu	Leu	115	120	125	
Asn	Tyr	Lys	Gly	Phe	Leu	Ala	Cys	Gln	Ala	His	Arg	Val	Ala	His	Lys	130	135	140	
Leu	Trp	Thr	Gln	Ser	Arg	Arg	Pro	Leu	Ala	Leu	Ala	Leu	Gln	Ser	Arg	145	150	155	160
Ile	Ser	Asp	Val	Phe	Ala	Val	Asp	Ile	His	Pro	Ala	Ala	Lys	Ile	Gly	165	170	175	
Lys	Gly	Ile	Leu	Phe	Asp	His	Ala	Thr	Gly	Val	Val	Val	Gly	Glu	Thr	180	185	190	
Ala	Val	Ile	Gly	Asn	Asn	Val	Ser	Ile	Leu	His	His	Val	Thr	Leu	Gly	195	200	205	
Gly	Thr	Gly	Lys	Ile	Gly	Gly	Asp	Arg	His	Pro	Lys	Ile	Gly	Asp	Gly	210	215	220	
Val	Leu	Ile	Gly	Ala	Gly	Ala	Thr	Ile	Leu	Gly	Asn	Val	Arg	Ile	Gly	225	230	235	240
Glu	Gly	Ala	Lys	Ile	Gly	Ala	Gly	Ser	Val	Val	Leu	Ile	Asp	Val	Pro	245	250	255	
Pro	Arg	Thr	Thr	Ala	Val	Gly	Asn	Pro	Ala	Arg	Leu	Val	Gly	Gly	Lys	260	265	270	
Glu	Gln	Pro	Thr	Lys	His	Glu	Glu	Cys	Pro	Gly	Glu	Ser	Met	Asp	His	275	280	285	

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. August 2002 (08.08.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/061106 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12P 13/12**,
C12N 15/29

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/01122

(22) Internationales Anmeldedatum:
4. Februar 2002 (04.02.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 04 722.3 2. Februar 2001 (02.02.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **IPK - INSTITUT FÜR PFLANZENGENETIK
UND KULTURPFLANZENFORSCHUNG [DE/DE];**
Corrensstrasse 3, 06466 Gatersleben (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **WIRTZ, Markus**
[DE/DE]; Markt 12, 06484 Quedlinburg (DE). **HELL,**
Rüdiger [DE/DE]; Brechtstrasse 8, 06484 Quedlinburg
(DE).

(74) Anwalt: **NEUEFEIND, Regina;** Maiwald Patentanwalts
GmbH, Elisenhof, Elisenstrasse 3, 80335 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 13. März 2003

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING CYSTEINE, CYSTINE AND GLUTATHIONE BY FERMENTATION

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR FERMENTATIVEN HERSTELLUNG VON CYSTEIN, CYSTIN UND GLUTATHION

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting genes and DNA- sequences which code for the enzyme serine acetyl-transferase (SAT) and are suitable for the production of cysteine by fermentation. The invention relates to a method for producing compounds containing sulphur such as cysteine, cystine and glutathione in bacteria and other host organisms by overexpression of SAT genes, wherein the host organism is disturbed in their own glutathione synthesis.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Auffindung von Genen und DNA-Sequenzen, die für das Enzym Serin-Acetyltransferase (SAT) kodieren und für die fermentative Herstellung von Cystein geeignet sind. Weiter betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung schwefelhaltiger Verbindungen wie Cystein, Cystin und Glutathion in Bakterien und anderen Wirtsorganismen mittels Überexpression von SAT-Genen, wobei der Wirtsorganismus in seiner eigenen Glutathionsynthese gestört ist.

WO 02/061106 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/01122

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12P13/12 C12N15/29

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TAKAGI HIROSHI ET AL: "Overproduction of L-cysteine and L-cystine by expression of genes for feedback inhibition-insensitive serine acetyltransferase from Arabidopsis thaliana in Escherichia coli." FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 179, no. 2, 15 October 1999 (1999-10-15), pages 453-459, XP002209321 ISSN: 0378-1097 see the whole document	9-14
Y	---	1-8
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 August 2002

Date of mailing of the international search report

12.11.02

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Grosskopf, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter al Application No

PCT/EP 02/01122

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>HOWARTH ET AL: "cysteine biosynthesis in higher plants;a new member of the Arabidopsis thaliana serine acetyltransferase small gene-family obtained by functional complementation of an Escherichia coli cysteine auxotroph" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. GENE STRUCTURE AND EXPRESSION, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1350, 1997, pages 123-127, XP002115632 ISSN: 0167-4781 see the whole document especially the abstract ---</p>	11-14
Y	<p>NAKAMORI ET AL: "overproduction of L-cysteine and L-cystine by Escherichia coli strains with a genetically altered serine acetyltransferase" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON,DC, US, vol. 64, no. 5, May 1998 (1998-05), pages 1607-1611, XP002115630 ISSN: 0099-2240 see abstract ---</p>	1-8
A	<p>NOJI ET AL: "ISOFORM-DEPENDENT DIFFERENCES IN FEEDBACK REGULATION AND SUBCELLULAR LOCALIZATION OF SERINE ACETYLTRANSFERASE INVOLVED IN CYSTEINE BIOSYNTHESIS FROM ARABIDOPSIS THALIANA" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 273, no. 49, 4 December 1998 (1998-12-04), pages 32739-32745, XP002115629 ISSN: 0021-9258 ---</p>	
A	<p>HELL R: "MOLECULAR PHYSIOLOGY OF PLANT SULFUR METABOLISM" PLANTA, SPRINGER VERLAG, DE, vol. 202, 1997, pages 138-148, XP000856032 ISSN: 0032-0935 see page 143 -----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP02/01122

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-14

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

EP02/01122

1. Claims 1-14

method of preparing sulfur-containing compounds in a microorganism that contains a heterologous DNA sequence coding cysteine-insensitive serine acetyltransferase, and method of discovering such sequences.

2. Claim 15

DNA sequences that code for a protein with the enzymatic activity of a serine acetyltransferase from *Nicotinia tabacum*, and equivalents thereof.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter - des Aktenzeichen

PCI/EP 02/01122

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12P13/12 C12N15/29

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12P C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	TAKAGI HIROSHI ET AL: "Overproduction of L-cysteine and L-cystine by expression of genes for feedback inhibition-insensitive serine acetyltransferase from Arabidopsis thaliana in Escherichia coli." FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, Bd. 179, Nr. 2, 15. Oktober 1999 (1999-10-15), Seiten 453-459, XP002209321 ISSN: 0378-1097	9-14
Y	see the whole document	1-8

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. August 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

12.11.02

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Grosskopf, R

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter alios Aktenzeichen

PCT/EP 02/01122

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>HOWARTH ET AL: "cysteine biosynthesis in higher plants;a new member of the Arabidopsis thaliana serine acetyltransferase small gene-family obtained by functional complementation of an Escherichia coli cysteine auxotroph" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. GENE STRUCTURE AND EXPRESSION, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 1350, 1997, Seiten 123-127, XP002115632 ISSN: 0167-4781 see the whole document especially the abstract</p>	11-14
Y	<p>NAKAMORI ET AL: "overproduction of L-cysteine and L-cystine by Escherichia coli strains with a genetically altered serine acetyltransferase" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON,DC, US, Bd. 64, Nr. 5, Mai 1998 (1998-05), Seiten 1607-1611, XP002115630 ISSN: 0099-2240 see abstract</p>	1-8
A	<p>NOJI ET AL: "ISOFORM-DEPENDENT DIFFERENCES IN FEEDBACK REGULATION AND SUBCELLULAR LOCALIZATION OF SERINE ACETYLTRANSFERASE INVOLVED IN CYSTEINE BIOSYNTHESIS FROM ARABIDOPSIS THALIANA" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, Bd. 273, Nr. 49, 4. Dezember 1998 (1998-12-04), Seiten 32739-32745, XP002115629 ISSN: 0021-9258</p>	
A	<p>HELL R: "MOLECULAR PHYSIOLOGY OF PLANT SULFUR METABOLISM" PLANTA, SPRINGER VERLAG, DE, Bd. 202, 1997, Seiten 138-148, XP000856032 ISSN: 0032-0935 see page 143</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/01122

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erweisen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich _____
2. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich _____
3. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen enthalten:
1-14

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN**PCT/ISA/ 210****1. Ansprüche: 1-14**

Verfahren zur Herstellung von Schwefel-haltigen Verbindungen in einem Mikroorganismus, der eine heterologe Cystein-insensitive Serin-Acetyltransferase kodierende DNA-Sequenz enthält, und Verfahren zur Auffindung solcher Sequenzen

2. Anspruch : 15

DNA Sequenzen, die für ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Serin-Acetyltransferase aus *Nicotinia tabacum* kodiert und Äquivalente davon

